

Université de Montréal

## **Rôle des androgènes dans la réabsorption rénale du calcium.**

Par Denis Couchourel  
Département de médecine  
Faculté de médecine

Thèse présentée à la faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de docteur ès sciences (Ph.D)  
en sciences biomédicales

Avril 2005

© Denis Couchourel, 2005



W

4

U58

2006

V. 057

## **AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## **NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée

**Rôle des androgènes dans la réabsorption rénale du calcium.**

Présenté par :

Denis Couchourel

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Alain Bonnardeaux

Président rapporteur

Dr Michèle Gagnan-Brunette

Directrice de recherche

Dr John Chan

Membre du jury

Dr Andrey Cybulsky

Examineur externe



## RÉSUMÉ

Les androgènes induisent des mouvements de calcium à travers la membrane plasmique de lymphocytes T (*Benten et al.*, 1999). Ces stéroïdes agissent selon une cinétique rapide (*Lieberherr and Grosse*, 1994), incompatible avec un mode d'action génomique. Or, le vieillissement chez l'homme est caractérisé par une baisse du taux de testostérone sérique et par une ostéoporose qui peut être très marquée (*Hampson et al.*, 2002). Dans le cadre d'une supplémentation thérapeutique en androgènes, y aurait-il des effets sur la calciurie et donc sur la quantité de calcium disponible pour le remodelage osseux ? Nous proposons donc de tester les effets des androgènes sur la réabsorption calcique *in vitro* par des vésicules construites à partir de membranes lumineales de cellules de tubules proximaux et distaux de lapin, préalablement incubées en présence d'androgènes. Les résultats montrent que la testostérone ( $10^{-10}$ M, concentration physiologique) stimule la réabsorption du calcium par les membranes lumineales du tubule distal et ce, après un temps d'incubation de 5 min, suggérant un mode d'action non génomique. Les résultats sont identiques si les cellules tubulaires sont incubées en présence de testostérone et d'acétate de cyprotérone (inhibiteur du récepteur cytoplasmique des androgènes) ou en présence de cycloheximide (inhibiteur de la synthèse protéique). De plus, lorsque la testostérone est liée de façon covalente avec la BSA, l'augmentation du transport de calcium est comparable à celle obtenue avec la testostérone libre. L'hormone ne semble donc pas agir via son récepteur génomique intracellulaire mais par le biais d'un récepteur membranaire de la classe des récepteurs tyrosines kinases puisque le transport calcique est inhibé par le genistein.

Ni l'adénylate cyclase, ni la PKC ne semblent être impliquées dans la transmission du signal vers les canaux calciques. Par contre, le fait que les vésicules issues de cellules tubulaires incubées avec du PD98059 et de la testostérone ne montrent pas d'augmentation du transport calcique suggère que la voie de transduction associée impliquerait la MAP kinase ERK.

L'étude des cinétiques de réabsorption met en évidence deux types de canaux calciques dans les vésicules, la testostérone agissant sur les

canaux de basse affinité au calcium. Ceux-ci sont bloqués par le mibéfradil, inhibiteur spécifique des canaux de type T, connus pour être présents dans l'encéphale mais aussi dans le rein.

Ces résultats ont pu être validés par des études en cytométrie de flux et en western blot effectuées sur des cellules MDCK qui, en présence de testostérone, montrent aussi une augmentation significative de la concentration calcique intracellulaire selon une cinétique rapide, comparable à celle obtenue sur les vésicules tubulaires distales de lapin. Ce modèle nous a permis de confirmer la nature des kinases mises en jeu dans le phénomène observé ainsi que d'émettre un certain nombre d'hypothèses concernant la nature du récepteur membranaire nécessaire à l'action rapide des androgènes sur le néphron distal.

Mots clefs : androgènes, testostérone, réabsorption calcique, calciurie, effets non génomiques, MAP kinases.

## ABSTRACT

Androgens induce calcium movements through the plasma membrane in T lymphocytes (*Benten et al.*, 1999). These steroids act in a short time frame (*Lieberherr and Grosse*, 1994) incompatible with a genomic pathway. However, aging in man is characterized by a lower testosterone concentration and sometimes by a severe osteoporosis (*Hampson et al.*, 2002). In the perspective of therapeutic supplementation with androgens, would there be effects on calciuria and therefore on the amount of calcium available for bone remodelling?

We thus propose to test the effects of androgens on calcium renal reabsorption in vitro using vesicles prepared from luminal membranes of proximal and distal rabbit tubule cells. The results show that incubation of 5 min with testosterone ( $10^{-10}$  M, a physiological concentration) stimulates calcium reabsorption by the luminal membranes of the distal tubule, suggesting a non-genomic mode of action. The results are similar when tubular cells are incubated with testosterone in the presence cyproterone acetate, an inhibitor of the androgen cytoplasmic receptor, or of cycloheximide, an inhibitor of protein synthesis. Moreover, when testosterone is bound covalently with bovine serum albumin, the increase in calcium transport is comparable to the increase obtained with the free hormone. Testosterone therefore acts not via its intracellular receptor, but rather through a membrane receptor. Since testosterone-induced calcium transport is inhibited by genistein, this membrane receptor is probably part of the tyrosine kinase receptor family.

Kinetic studies of calcium influx implicate at least two types of calcium channels, of high and low affinity, and testosterone acts exclusively on the low affinity component. This low affinity component is blocked by mibefradil, an inhibitor specific for T-type calcium channels, which are known to be present in the kidney.

Neither Adenylate cyclase nor PKC are implicated in the transmission of the signal towards the calcium channels. On the other hand, vesicles prepared from tubular cells incubated with testosterone and PD98059 do not show any increase in calcium transport, suggesting a MAP kinase ERK dependent signalling pathway.

These results were validated in MDCK cells by studies using flow cytometry and Western blots. These cells treated with  $10^{-10}$  M testosterone also show a significant increase in the intracellular calcium concentration similar to those obtained using vesicles, and with similar kinetics. This model enabled us to confirm the nature of the kinases involved in the observed phenomenon and to propose some hypotheses concerning the nature of the membrane receptors responsible for the fast action of androgens on the distal nephron.

Keywords: androgens, testosterone, calcium reabsorption, calciuria, non-genomic effects, MAP kinases.

# TABLE DES MATIÈRES

Page de titre.....	i
Identification du jury.....	ii
Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Table des matières.....	vii
Liste des figures.....	xv
Liste des tableaux.....	xviii
Liste des abréviations.....	xix
Remerciements.....	xxi
Dédicace.....	xxii

## I INTRODUCTION

<b>1 Le calcium : homéostasie et réabsorption rénale.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Le récepteur au calcium (<math>\text{Ca}^{2+}</math> sensing receptor, CaR).....</b>	<b>1</b>
1.1.1 <i>Structure moléculaire du CaR.....</i>	<i>2</i>
1.1.2 <i>Le CaR dans le rein : localisation.....</i>	<i>3</i>
1.1.3 <i>Le CaR dans le rein : rôle physiologique.....</i>	<i>3</i>
1.1.3.1 <i>Membrane apicale.....</i>	<i>3</i>
1.1.3.2 <i>Membrane basolatérale.....</i>	<i>5</i>
1.1.4 <i>Importance du CaR.....</i>	<i>6</i>
<b>1.2 Régulation hormonale de l'homéostasie calcique.....</b>	<b>6</b>
1.2.1 <i>La parathormone.....</i>	<i>6</i>
1.2.1.1 <i>Effets de la PTH sur les os.....</i>	<i>8</i>
1.2.1.2 <i>Effets de la PTH sur les reins.....</i>	<i>8</i>
1.2.1.3 <i>Effets de la PTH sur le système digestif.....</i>	<i>9</i>
1.2.2 <i>La calcitonine.....</i>	<i>11</i>
1.2.2.1 <i>Effets de la calcitonine sur le tissu osseux.....</i>	<i>11</i>
1.2.2.2 <i>Effets de la calcitonine sur le rein.....</i>	<i>11</i>
1.2.3 <i>La vitamine D.....</i>	<i>13</i>
1.2.3.1 <i>Régulation par la PTH.....</i>	<i>15</i>
1.2.3.2 <i>Régulation par le calcium.....</i>	<i>15</i>

1.2.3.3 Régulation par le pH.....	15
1.2.3.4 Régulation par les ions phosphates.....	15
1.2.3.5 Régulation par l'insuline et IGF-1.....	16
1.2.3.6 Régulation par la 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> .....	16
1.2.3.7 Le récepteur de la vitamine D (VDR).....	17
1. 2.3.8 Actions biologiques de la vitamine D.....	17
<i>A L'intestin.....</i>	17
<i>B Le squelette.....</i>	17
<i>C Les glandes parathyroïdes .....</i>	18
<i>D Le rein.....</i>	18
<b>1.3 Les épithéliums de réabsorption.....</b>	<b>19</b>
1.3.1 <i>Les canaux calciques voltage dépendants.....</i>	21
1.3.1.1 Structure générale.....	21
<i>A Sous-unité α-1.....</i>	22
<i>B Sous-unité α-2 et δ.....</i>	22
<i>C Sous-unité β.....</i>	22
<i>D Sous-unité γ.....</i>	22
1.3.1.2 Les canaux calciques de type L.....	22
1.3.1.3 Les Canaux de type N.....	23
1.3.1.4 Les canaux de type P/Q.....	24
1.3.1.5 Les canaux de type T.....	24
1.3.1.6 Les canaux de type R.....	26
1.3.2 <i>Les canaux voltage indépendants.....</i>	26
1.3.3 <i>Le transport paracellulaire passif.....</i>	28
1.3.4 <i>Le transport trans-cellulaire actif.....</i>	30
1.3.4.1 L'entrée de calcium dans la cellule.....	30
1.3.4.2 La diffusion cytosolique. ....	32
1.3.4.3 L'extrusion du calcium.....	34
<i>A L'échangeur Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> (NCX).....</i>	34
<i>B ATPase Ca<sup>2+</sup> dépendante (PMCA).....</i>	35
1.3.5 <i>Le tubule proximal.....</i>	36
1.3.6 <i>L'anse de Henlé.....</i>	37
1.3.7 <i>Le tubule contourné distal.....</i>	38
1.3.8 <i>Le tubule collecteur.....</i>	39

<b>2 La testostérone.</b>	<b>41</b>
<b>2.1 Stéroïdogénèse dans les cellules de Leydig</b>	<b>41</b>
2.1.1. Conversion du cholestérol en pregnenolone. (réaction 1)	42
2.1.2. Conversion des stéroïdes 3 $\beta$ - hydroxy 5-ène en stéroïdes 3 kéto-4-ène (réaction 2)	43
2.1.3. Conversion des stéroïdes C-21 en stéroïdes C-19 (réaction 3)	44
2.1.4. Conversion des 17 $\beta$ hydroxystéroïdes en 17 kétéstéroïdes (réaction 4)	44
2.1.5. Conversion des androgènes en œstrogènes (réaction 5)	45
2.1.6. Conversion de la testostérone en dihydrotestostérone (DHT) (réaction 6)	45
<b>2.2 Tissus cibles : actions génomiques de la testostérone.</b>	<b>46</b>
2.2.1 Structure du récepteur aux androgènes	46
2.2.2 Distribution du récepteur aux androgènes	48
2.2.3 Régulation des récepteurs aux androgènes	49
2.2.3.1 Phosphorylations	49
2.2.3.2 Coactivateurs	49
2.2.3.3 Corépresseurs	50
<b>2.3 Les stéroïdes: Classification de Mannheim</b>	<b>51</b>
2.3.1 Action directe sans récepteur impliqué. (A.I)	52
2.3.2 Action directe via les récepteurs classiques génomiques. (A.II.a)	53
2.3.3 Action directe via un récepteur non classique (A.II.b)	54
2.3.4 Action indirecte via un récepteur non classique (B.II.b)	55
<b>2.4 Effets non génomiques de la testostérone</b>	<b>56</b>

<b>3 Conséquences physiologiques des carences en androgènes.....</b>	<b>57</b>
<b>3.1 Épidémiologie et physiopathologie de l'andropause.....</b>	<b>58</b>
3.1.1 <i>Diminution de la testostérone avec l'âge.....</i>	<i>58</i>
3.1.2 <i>Augmentation de la 'sex hormone binding protein' avec l'âge.....</i>	<i>59</i>
3.1.3 <i>Altération de la fonction gonadotrope avec l'âge.....</i>	<i>59</i>
3.1.4 <i>Effets de l'âge sur la fonction testiculaire exocrine.....</i>	<i>60</i>
<b>3.2 Symptomatologie du déficit androgénique partiel.....</b>	<b>60</b>
3.2.1 <i>Tissus musculaires.....</i>	<i>60</i>
3.2.2 <i>Testostérone et comportement.....</i>	<i>61</i>
3.2.3 <i>Testostérone et dépression.....</i>	<i>62</i>
3.2.4 <i>Testostérone et sexualité.....</i>	<i>63</i>
3.2.5 <i>Testostérone et maladies cardio-vasculaires.....</i>	<i>63</i>
3.2.6 <i>Testostérone et cancer de la prostate.....</i>	<i>64</i>
3.2.7 <i>Tissus osseux.....</i>	<i>65</i>
 <b>4 Hypothèse.....</b>	 <b>67</b>

## II MATÉRIELS ET MÉTHODES

<b>1 Effets de la testostérone sur la réabsorption calcique.....</b>	<b>69</b>
1.1 <b>Préparation des tubules.....</b>	<b>69</b>
1.2 <b>Préparation des membranes luminales.....</b>	<b>70</b>
1.3 <b>Mesure de l'activité des marqueurs enzymatiques.....</b>	<b>71</b>
1.3.1 <i>Activité de la phosphatase alcaline.....</i>	<i>71</i>



1.3.1.1 Solutions utilisées.....	70
1.3.1.2 Méthode.....	71
1.3.2 <i>Activité de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase</i> .....	71
1.3.2.1 Solutions utilisées.....	71
1.3.2.2 Méthode.....	72
<b>1.4 Mesure du transport de <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> par les vésicules luminales</b> .....	73
<b>1.5 Validations statistiques</b> .....	73
<b>1.6 Matériels</b> .....	74
<b>2. Identification des messagers impliqués</b> .....	74
2-1 Culture des cellules MDCK.....	74
2.2 Validation du modèle des cellules MDCK en culture.....	75
2.3 Buvarpage Western.....	75
2.3.1 <i>Préparation des extraits protéiques cellulaires</i> .....	75
2.3.2 <i>Migration sur gel, transfert sur membrane PVDF et révélation</i> .....	76
2.3.3 <i>Stripping de la membrane</i> .....	77
2.4 Cytofluorométrie en flux.....	77

## II RÉSULTATS

<b>1 Effets de la testostérone sur le transport de Ca<sup>2+</sup> par les membranes luminales des cellules du tubule contourné proximal</b> .....	79
1.1 Transport de calcium en fonction du temps.....	79
1.2 Courbe dose-réponse.....	79
<b>2 Effets des androgènes sur le transport de Ca<sup>2+</sup> par les membranes luminales des cellules du tubule contourné distal</b> .....	82

<b>2.1 Transport de calcium en fonction du temps, en présence ou en absence de sodium.....</b>	<b>83</b>
<b>2.2 Influence de la concentration en testostérone sur le transport de calcium.....</b>	<b>83</b>
<b>2.3 Effet de la testostérone sur les paramètres cinétiques du transport de calcium.....</b>	<b>87</b>
<b>2.4 L'augmentation du transport de calcium par la testostérone se fait par l'intermédiaire de l'ouverture de canaux calciques voltages dépendants de type T.....</b>	<b>90</b>
<b>2.5 Effet de la dihydroépiandrosterone sur le transport de calcium.....</b>	<b>94</b>
<b>2.6 Effet de la dihydrotestostérone sur le transport de calcium.....</b>	<b>94</b>
<b>2.7 La testostérone agit sur le transport de <math>Ca^{2+}</math> par un mécanisme d'action non génomique.....</b>	<b>97</b>
<i>2.7.1 Transport de <math>Ca^{2+}</math> en fonction du temps d'incubation..</i>	<i>97</i>
<i>2.7.2 Effet direct de la testostérone sur les vésicules luminales.....</i>	<i>97</i>
<i>2.7.3 Transport de calcium et synthèse protéique.....</i>	<i>98</i>
<i>2.7.4 Le récepteur aux androgènes n'intervient pas dans la voie de signalisation étudiée.....</i>	<i>102</i>
<b>2-8 La testostérone agit par un mécanisme mettant en œuvre la voie de signalisation dépendante des MAPK.....</b>	<b>106</b>
<i>2.8.1 Testostérone + Rp-AMPC et calphostin C.....</i>	<i>106</i>
<i>2.8.2 Testostérone + genistein.....</i>	<i>106</i>
<i>2.8.3 Testostérone + PD98059.....</i>	<i>109</i>
<b>3 Études réalisées sur les cellules MDCK en culture.....</b>	<b>112</b>
<b>3.1 La testostérone provoque un influx de calcium dans les cellules MDCK en culture.....</b>	<b>112</b>
<b>3.2 Mise en évidence de la phosphorylation de ERK dans les cellules MDCK.....</b>	<b>113</b>
<b>3.3 Mise en évidence de la phosphorylation de MEK dans les</b>	

cellules MDCK.....	116
--------------------	-----

### III DISCUSSION

<b>1 Pureté des préparations membranaires.....</b>	<b>120</b>
<b>2 La testostérone influence t-elle la réabsorption du calcium par les cellules du tubule contourné proximal.....</b>	<b>121</b>
<b>3 La testostérone augmente la réabsorption du calcium par les cellules du tubule contourné distal.....</b>	<b>122</b>
3.1 La testostérone agit à une concentration physiologique....	123
3.2 La testostérone active des canaux de basse affinité au calcium.....	125
3.3 La testostérone agit sur des canaux de type T.....	126
<b>4 La dihydroépiandrostérone et la dihydrotestostérone sont deux des androgènes les plus actifs <i>in vivo</i> : ont-ils un effet sur la réabsorption du calcium ?.....</b>	<b>129</b>
<b>5 La testostérone influence-t-elle le transport de calcium par un mécanisme d'action non génomique ?.....</b>	<b>132</b>
5.1 La testostérone agit sur les tubules après un temps d'incubation très court.....	132
5.2 La testostérone n'a pas d'effet direct sur les vésicules membranaires. ....	133
5.3 La testostérone agit selon un mode d'action non génomique.....	134
5.3.1 <i>L'augmentation du transport de calcium est indépendante de la transcription.....</i>	<i>134</i>
5.3.2 <i>L'augmentation du transport de calcium est indépendante du récepteur aux androgènes AR.....</i>	<i>135</i>

5.3.3 La testostérone agit au niveau membranaire.....	136
5.3.4 La PKA et la PKC ne font pas partie de la cascade signalétique conduisant à l'ouverture des canaux calciques dans les cellules distales.....	137
5.3.5 Une activité tyrosine kinase est nécessaire pour que la testostérone stimule la réabsorption du calcium dans le tubule distal.....	139
5.3.6 La sérine/thréonine kinase ERK est activée par la testostérone.....	142
<b>6 Modèle prospectif des effets non génomiques des androgènes sur les cellules du tubule distal.....</b>	<b>144</b>
<b>IV CONCLUSION.....</b>	<b>148</b>
<b>Liste des références.....</b>	<b>150</b>
<b>Annexe 1 : publications issues de ce travail.....</b>	<b>183</b>

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : Représentation schématique de la voie de biosynthèse de la testostérone dans le testicule.....	4
<b>Figure 2</b> : effets de la calcitonine sur le segment distal du néphron de lapin.....	12
<b>Figure 3</b> : Flux journaliers entre les différents compartiments de l'organisme impliqués dans la régulation du calcium absorbé.....	20
<b>Figure 4</b> : Détail d'une jonction serrée et de ses composantes moléculaires.....	29
<b>Figure 5</b> : Représentation schématique de la voie de biosynthèse de la testostérone dans le testicule. ....	42
<b>Figure 6</b> : Domaines fonctionnels du récepteur aux androgènes humain.....	47
<b>Figure 7</b> : Classification des actions non génomiques des stéroïdes.....	52
<b>Figure 8</b> : Effet de la testostérone (5 min d'incubation à 37°C) sur le transport de calcium (0,5M) par les membranes luminales du tubule proximal.....	81
<b>Figure 9</b> : Effet de la testostérone (5 min d'incubation à 37°C) sur le transport de calcium (0,5M) par les membranes luminales du tubule proximal. Courbe dose-réponse. $\text{Na}^+=0$ .....	82
<b>Figure 10</b> : Effet de la testostérone ( $10^{-10}\text{M}$ ) après une incubation de 5 min à 37°C sur le transport de calcium (0,5M) par les membranes luminales du tubule distal. $\text{Na}^+=0$ .....	84
<b>Figure 11</b> : Effet de la testostérone ( $10^{-10}\text{M}$ ) après une incubation de 5 min à 37°C sur le transport de calcium (0,5M) par les membranes luminales du tubule distal. $\text{Na}^+=100\text{ mM}$ .....	85

<b>Figure 12</b> : Effet de la testostérone (5 min d'incubation, 37°C, en présence des tubules distaux) sur le transport de calcium (0,5M) Courbe dose-réponse. $\text{Na}^+=0$ .....	86
<b>Figure 13</b> : Effets de la testostérone ( $10^{-10}\text{M}$ ) sur le transport de calcium (concentrations variables) par les membranes lumineales distales.....	88
<b>Figure 14</b> : Effet du diltiazem ( $50.10^{-6}\text{M}$ ) sur le transport de calcium activé par la testostérone, à 37°C.....	91
<b>Figure 15</b> : Effet de l' $\omega$ -conotoxine MVIIC ( $100.10^{-9}\text{M}$ ) sur le transport de calcium activé par la testostérone, à 37°C.....	92
<b>Figure 16</b> : Effet du mibéfradil ( $10^{-6}\text{M}$ ) sur le transport de calcium activé par la testostérone, à 37°C.....	93
<b>Figure 17</b> : Effet de la dihydroépiandrosterone (5 min d'incubation, 37°C, en présence des tubules distaux) sur le transport de calcium (0,5M). Courbe dose-réponse. $\text{Na}^+=0$ .....	95
<b>Figure 18</b> : Effet de la dihydrotestostérone (5 min d'incubation, 37°C, en présence des tubules distaux) sur le transport de calcium (0,5M). Courbe dose-réponse. $\text{Na}^+=0$ .....	96
<b>Figure 19</b> : Effet de la testostérone ( $10^{-10}\text{M}$ ) sur le transport de 0,5 mM de calcium par les membranes lumineales distales. Variation avec le temps d'incubation. $\text{Na}^+=0$ .....	99
<b>Figure 20</b> : Effet de la testostérone ( $10^{-10}\text{M}$ ), appliquée directement sur les vésicules membranaires à 37°C, sur le transport de calcium (0,5M) par les membranes lumineales du tubule distal. $\text{Na}^+=0$ mM.....	100
<b>Figure 21</b> : Effet de la cycloheximide ( $10^{-6}\text{M}$ ) sur le transport de calcium activé par la testostérone, à 37°C.....	101
<b>Figure 22</b> : Effet de l'acétate de cyprotérone ( $10^{-5}\text{M}$ ) sur le transport de calcium activé par la testostérone, à 37°C.....	103

<b>Figure 23</b> : Effet de la flutamide ( $10^{-6}$ M) sur le transport de calcium activé par la testostérone, à 37°C.....	104
<b>Figure 24</b> : Effet de la testostérone-BSA ( $10^{-10}$ M) sur le transport de calcium activé par la testostérone, à 37°C.....	105
<b>Figure 25</b> : Effet du calphostin C ( $10^{-4}$ M) et du Rp-AMPc ( $10^{-4}$ M) sur le transport de calcium activé par la testostérone, à 37°C.....	107
<b>Figure 26</b> : Effet du genistein ( $10^{-6}$ M) sur le transport de calcium activé par la testostérone, à 37°C.....	108
<b>Figure 27</b> : Activation des MAPK de la famille ERK.....	109
<b>Figure 28</b> : Effet du PD98059 ( $10^{-6}$ M) sur le transport de calcium activé par la testostérone, à 37°C.....	111
<b>Figure 29</b> : Immunobuvardage Western effectué sur les cellules MDCK en culture. P-ERK (ERK phosphorylé).....	114
<b>Figure 30</b> : Immunobuvardage Western effectué sur les cellules MDCK en culture. P-ERK (ERK phosphorylé). Mesure de la phosphorylation de ERK en fonction du temps.....	115
<b>Figure 31</b> : Immunobuvardage Western effectué sur les cellules MDCK en culture. P-ERK (ERK phosphorylé). Les cellules sont incubées avec $10^{-10}$ M testostérone $10^{-5}$ M U0126, $10^{-9}$ M AG99 et $10^{-6}$ M acétate de cyprotérone.....	117
<b>Figure 32</b> : Mise en évidence de la phosphorylation de ERK par FACS. L'anticorps secondaire est couplé au FITC détecté sur le canal FL1.....	118
<b>Figure 33</b> : Mise en évidence de la phosphorylation de MEK par FACS. L'anticorps secondaire est couplé au FITC détecté sur le canal FL1.....	119
<b>Figure 34</b> : Modèle théorique des effets non génomiques de la testostérone sur la réabsorption du calcium dans les cellules du tubule distal.....	145

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Table 1</b> : Abondance relative des ARNm codant pour AR en fonction des tissus chez le rat. Données en pourcentages d'ARNm détectés dans la prostate de 5 mâles. ND : non déterminé. D'après ( <i>Young W.J et al., 1994</i> ).....	49
<b>Table 2</b> : Activités enzymatiques dans les différentes préparations. X : enrichissement comparé aux valeurs obtenues pour le cortex. Indique la pureté des membranes.....	74
<b>Table 3</b> : Effet de la testostérone ( $10^{-10}$ M) sur les paramètres cinétiques du transport calcique par les membranes du tubule distal.....	89
<b>Table 4</b> : Quantité de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ entrée dans les cellules MDCK sous l'influence de la testostérone. Les résultats sont exprimés en pourcentages par rapport au contrôle. n=1.....	113
<b>Table 5</b> : Les différents isoformes de $G\alpha$ et leurs effecteurs respectifs.....	139



## LISTE DES ABBRÉVIATIONS

**1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>** : 1-25 dihydroxyvitamine D<sub>3</sub>

**17β HSD** : 17β hydroxystéroïde déshydrogénase

**3β-HSD** : 3β-hydroxystéroïde déshydrogénase/5-ène-4-ène isomérase

**ADNc**: Acide désoxyribonucléique complémentaire

**AR** : androgen receptor

**ARE**: androgen response element

**ARNm** : Acide ribonucléique messenger

**CaR** : calcium receptor

**CCD**: collecting duct

**CGRP** : calcitonin gene-related peptide

**DAG** : diacyl glycérol

**DBI**: diazepam binding inhibitor

**DCT**: tubule contourné distal

**DHT**: dihydrotestostérone

**ER**: estrogen receptor

**FSH**: follicle stimulating hormone

**GABA**: gamma aminobutyric acid

**GnRH**: gonadotropine release hormone

**HDL**: high density lipoprotein

**HVA**: high voltage activation

**IGF1**: insulin-like growth factor 1

**IP<sub>3</sub>**: inositol triphosphate

**K<sub>m</sub>**: constante de Michaelis-Menten

**LDL**: low density lipoprotein

**LH:** luteinizing hormone

**LVA:** low voltage activation

**NCX:** échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

**P450<sub>aro</sub>:** P450 aromatase

**P450<sub>scc</sub>:** P450 side chain cholesterol cleavage

**P-450 17 $\alpha$ :** P450 17 $\alpha$  hydroxylase

**pH:** potentiel hydrogène

**PCT:** tubule contourné proximal

**PIP<sub>2</sub>:** phosphoinositol diphosphate

**PKA:** protéine kinase A

**PKC:** protéine kinase C

**PMCA :** ATPase  $\text{Ca}^{2+}$  dépendante

**PR:** progesterone receptor

**PTH:** parathyroid hormone

**PTH-Rp:** parathyroid hormone related peptide

**SCP2:** sterol carrier protein 2

**SAP:** steroidogenesis activator polypeptide

**SHBG:** sex hormone binding globulin

**TALH:** thick ascending limb of Henlé

**TGF $\beta$ :** tumor growth factor  $\beta$

**TRAP:** tartrate resistant acid phosphatase

**THDOC:** tetrahydrodéoxy cortisone

**VDR:** vitamin D receptor

**VDRE:** vitamin D response element

**Vmax:** vitesse maximale

## REMERCIEMENTS

Ma famille proche a joué un rôle tout particulier dans ce travail. L'éloignement a rendu très précieux les encouragements et les marques d'affection de ma maman et de ma grand-mère. Merci de m'avoir soutenu de la sorte, de n'avoir pas douté de moi et pour tout ce que vous m'avez donné avant et après ce grand départ. Ce travail est aussi le vôtre.

Je désire également exprimer toute ma gratitude à l'égard de celles et ceux qui ont rendu possible l'accomplissement de cette thèse, ici au Québec. En premier lieu, le Dr Michèle Gagnan-Brunette pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour son appui scientifique sans failles durant ces quelques années. Qu'elle soit aussi chaleureusement remerciée pour sa bonne humeur communicative. Je rendrais aussi un hommage tout particulier à Mme Marie Leclerc et au docteur Yves Paquette pour leur soutien moral de tous les instants, leur disponibilité et leurs compétences. Je suis très fier de dire aujourd'hui qu'ils sont devenus des amis. Un grand merci aussi au docteur Janos Filep d'avoir usé de son temps avec moi pour des discussions aussi passionnantes que constructives et de m'avoir aidé à élaborer un certain nombre d'expériences étayant cette thèse. Je n'oublie pas non plus Mme Sophie Ouellet pour m'avoir initié aux arcanes de la cytométrie en flux.

Je remercie également tout le personnel du centre de recherche Guy Bernier, les étudiants des différents laboratoires et particulièrement Mme Claudette Plante pour son aide et pour son soutien.

## DÉDICACE

*À Yvon.*

# I INTRODUCTION.

## 1 Le calcium : homéostasie et réabsorption rénale.

Le calcium est un élément essentiel pour l'organisme. Chez l'homme, environ 27000 mmoles de calcium sont contenues dans le squelette alors que 70 mmoles seulement sont présentes dans les fluides intra et extracellulaires. Le calcium extracellulaire peut se retrouver sous trois formes : 1) non ionisée, liée aux protéines (50%), 2) associée aux anions (5%) et 3) sous forme de cations divalents (45%). La concentration sérique en albumine est donc d'une grande importance puisqu'elle influence directement la quantité de  $\text{Ca}^{2+}$  libre dans le plasma.

La concentration sanguine en calcium ionisé est remarquablement stable chez le sujet sain. Elle varie entre 1 et 1,3 mM en conditions physiologiques. L'homéostasie est maintenue grâce à trois systèmes : 1) les récepteurs au calcium à la surface des cellules qui leur permettent de réagir à une variation de la concentration calcique dans leur microenvironnement, 2) les glandes endocrines chargées de synthétiser et de relarguer les hormones calcitropiques et 3) les tissus effecteurs (intestin, reins et os) qui répondent aux hormones en modifiant le transport calcique de manière à ramener la concentration calcique extracellulaire à une valeur nominale.

### 1.1 Le récepteur au calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ sensing receptors, CaR)

Le calcium est un cofacteur allostérique dans de nombreuses réactions enzymatiques. Il est aussi utilisé comme transporteur de charges et second messenger dans les phénomènes de sécrétion, de transmission neurale et de contraction musculaire. De plus, le calcium est aussi un composant essentiel de la matrice osseuse, cartilagineuse et dentaire. Il est donc vital pour un organisme, même unicellulaire, de pouvoir détecter et évaluer la concentration de calcium à

tout moment afin de réguler de façon efficace et précise cette concentration même pour des changements de très faible amplitude.

### 1.1.1 Structure moléculaire du CaR.

Il est formé de trois zones principales : (1) EC-1, un segment extracellulaire de 600 acides aminés dans la zone N terminale, (2) une région 7-TM formée par 7 séquences transmembranaires (250 acides aminés) et enfin, (3) au niveau C terminal, une queue intracellulaire IC-4 d'environ 200 acides aminés.

EC-1 est le site de fixation du calcium (*Hammerland et al.* 1999) et aussi le site de glycosylations (*Bai* 1999). En outre, la présence de EC-1 donne au récepteur une capacité de dimérisation qui semble être un événement critique pour le bon fonctionnement du CaR (*Zhang et al.* 2001). Du côté intracellulaire, IC-4 est essentiel pour maintenir le récepteur dans une bonne conformation spatiale, ainsi que pour assurer une bonne transformation des stimuli extracellulaires en réponses intracellulaires (*Hauache et al.* 2000; *Chang et al.* 2000). Notamment, IC-4 comporte quelques acides aminés très conservés et localisés à proximité de la membrane qui jouent un rôle critique dans la transmission du signal ainsi que dans la migration du récepteur à la surface de la cellule (*Bai* 1999) (*Chang et al.* 2000). Des sites potentiels de phosphorylations par la PKC ont aussi été identifiés dans cette région (*Bai et al.* 1998). Par exemple, des études récentes ont montré que certains de ces acides aminés étaient capables d'induire la formation d'un complexe entre le CaR et la protéine d'échafaudage filamine A (*Pi et al.* 2002). Ce complexe est nécessaire à l'activation des MAP kinases par le CaR.

Après analyse de sa séquence en acides aminés, le CaR a été classé dans la famille C de la superfamille des récepteurs à protéine G (GPCRs) qui comporte aussi les récepteurs aux phéromones, aux molécules odorantes, les récepteurs du goût, au glutamate, et au neurotransmetteur acide  $\gamma$  amino butyrique (GABA). Sa structure primaire mais aussi tertiaire est très bien conservée, notamment grâce à la présence de résidus cystéine impliqués dans la formation de ponts disulfures.

### *1.1.2 Le CaR dans le rein : localisation.*

CaR est abondamment exprimé dans les reins. En effet, ses ARNm ont été détectés tout le long du néphron ( glomérule, tubule contourné proximal et tubule droit proximal, segment ascendant mince médullaire et cortical de l'anse de Henlé, tubule contourné distal, tubules collecteurs corticaux et médullaires (*Riccardi et al.* 1996). L'expression des protéines CaR est prédominante dans les tubules proximaux, les segments minces ascendants de l'anse de Henlé, et les tubules collecteurs corticaux (*Riccardi et al.* 1998). Plus précisément, le CaR a été mis en évidence au niveau des membranes apicales des cellules des tubules proximaux et des tubules collecteurs (*Sands et al.* 1997) tandis qu'il est préférentiellement exprimé sur les membranes basolatérales des cellules composant les segments ascendants de l'anse de Henlé (*Butters, Jr. et al.* 1997). Les motifs d'acides aminés responsables du ciblage de CaR sur l'un ou l'autre type de membranes n'ont pas encore été découverts.

### *1.1.3 Le CaR dans le rein : rôle physiologique.*

Le clonage moléculaire ainsi que la localisation de CaR le long du néphron ont permis de déterminer dans quelle mesure cette molécule influence la régulation hormonale de la réabsorption calcique précédemment décrite.

#### *1.1.3.1 Membrane apicale.*

Puisque CaR est situé sur les membranes luminales des cellules, il serait logique qu'il participe à la régulation de la composition du fluide péritubulaire. Les études du laboratoire de Wang aux États-Unis ont montré que l'activation de CaR réduisait l'activité du canal  $K^+$  de 70 pS situé dans la membrane apicale des cellules du segment ascendant de l'anse de Henlé (*Wang et al.* 1996). Cet événement réduirait ensuite le recyclage du  $K^+$  et donc pourrait limiter l'efficacité du

cotransporteur Na-K-2Cl (Figure 1). Le recyclage du  $K^+$  est aussi nécessaire pour la génération de la différence de potentiel responsable de la charge positive luminale observée dans ce segment du néphron. Puisque la réabsorption passive du calcium s'y fait notamment par la voie para-cellulaire, la réduction des courants potassiques suite à l'activation de CaR devrait donc conduire à la réduction de cette composante du transport calcique (Wang et al. 1996).

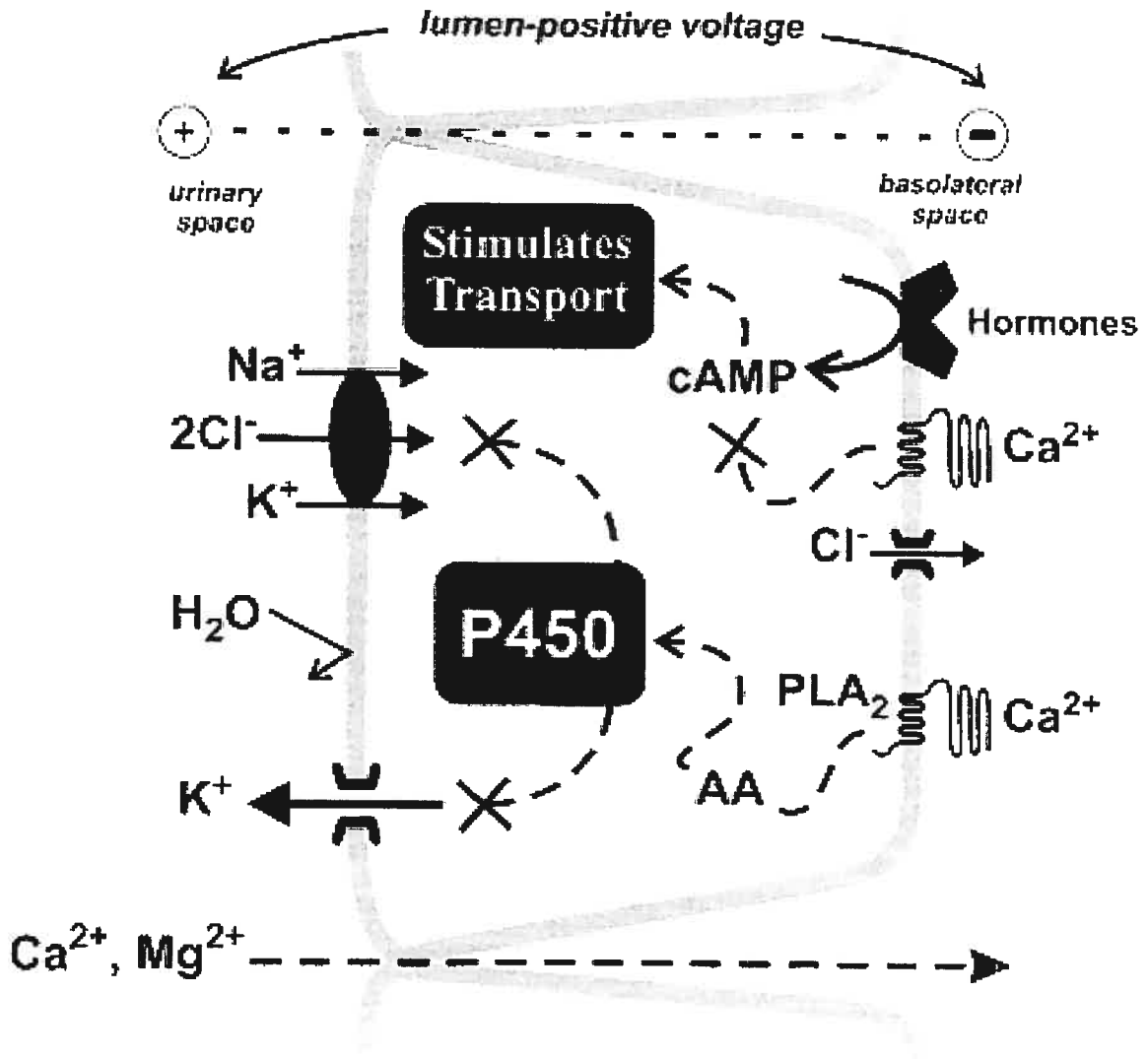


Figure 1: Mécanismes possibles par lesquels le CaR régule les transports ioniques dans les cellules apicales du néphron (d'après (Brown and Hebert 1997))



L'activation de CaR influe aussi sur la régulation de la réabsorption calcique par la PTH. En effet, une concentration élevée en calcium extracellulaire diminue significativement la synthèse d'AMPc dépendante de la PTH dans le segment ascendant cortical de l'anse de Henlé (*Takaichi and Kurokawa 1986*). De plus, l'agoniste de CaR, NPS R-467, supprime la réabsorption calcique PTH dépendante dans cette zone du néphron sans influencer sur les autres types de réabsorption, notamment para-cellulaire. Le mécanisme impliqué dans ce phénomène est encore discuté. Il pourrait s'agir d'une stimulation protéine G dépendante de la phospholipase C induisant une formation rapide d'IP<sub>3</sub> provoquant un relargage temporaire dans le cytoplasme des stocks de calcium intracellulaires (*Brown et al. 1993*). D'autres voies d'activation dépendantes de l'activation de CaR passant notamment par les protéines Gi, la phospholipase A<sub>2</sub>, la phospholipase D, les MAP kinases ou encore la PI-4 kinase ont été évoquées mais sont moins bien caractérisées (*Kifor et al. 1997*). La stimulation du transport de calcium par la PTH dans le tubule contourné distal nécessite l'activation de la protéine kinase A, via une protéine Gs (*Friedman et al. 1996*). La protéine Gi associée au CaR pourrait agir sur Gs et donc permettre au CaR d'empêcher l'action hypercalcémiant de la PTH.

#### 1.1.3.2 Membranes basolatérales.

Les études ont surtout été effectuées sur des cultures cellulaires polarisées de cellules MDCK. Les cellules MDCK expriment constitutivement CaR et l'ATPase Ca<sup>2+</sup> dépendante (*Blankenship et al. 2001*). Le fait d'augmenter la concentration calcique extracellulaire basolatérale provoque une inhibition dose dépendante de l'absorption calcique par les cellules. Cet effet peut être aussi obtenu avec l'agoniste de CaR, Gd<sup>3+</sup>. L'activité des ATPases Ca<sup>2+</sup> dépendantes devient virtuellement nulle lorsqu'elles sont exposées à une forte concentration calcique (5 mM). Donc l'action inhibitrice de CaR serait médiée par les ATPases (*Blankenship et al. 2001*) dans le but de réguler de façon coordonnée le transport calcique trans-cellulaire et de protéger le cytosol contre de trop grandes variations de calcium.

#### 1.1.4 Importance du CaR

Chez les sujets souffrant d'hypercalcémie hypocalciurique familiale, des mutations du gène codant pour CaR provoquent une perte de fonction partielle du CaR. En effet, la sensibilité des récepteurs au calcium est diminuée ce qui implique qu'une élévation beaucoup plus importante du calcium plasmatique est nécessaire pour provoquer l'inhibition de la synthèse de PTH par les glandes parathyroïdes (*Bai et al.* 1996). A l'inverse, d'autres mutations activatrices de CaR sont capables de provoquer une hypocalcémie hypercalciurique, comme par exemple dans le cas des hypocalcémies autosomiques dominantes (*Pollak et al.* 1994). Ces deux pathologies illustrent bien le rôle central que peut jouer le CaR dans la régulation fine de la concentration calcique.

L'activation du CaR provoque l'arrêt de la sécrétion de PTH par les cellules de la glande parathyroïde et augmente celle de calcitonine par les cellules C de la glande thyroïde.

### 1.2 Régulation hormonale de l'homéostasie calcique.

Elle est assurée par un système mettant en œuvre trois hormones calciotropiques qui ont pour cibles les os, l'intestin et les reins. L'homéostasie calcique est dépendante de l'action de l'hormone parathyroïdienne (PTH), de la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  et de la calcitonine sur ces organes.

#### 1.2.1 La PTH.

La PTH est un peptide de 84 acides aminés synthétisé par les cellules de la glande parathyroïde. La sécrétion de PTH diminue lorsque la calcémie augmente bien que cette sécrétion ne soit pas entièrement suppressible (*Kerstetter et al.* 2003). La PTH est donc hypercalcémiante. Sa synthèse semble être maximale dans des conditions physiologiques puisque des cellules

parathyroïdiennes exposées *in vitro* à des conditions d'hypercalcémie présentent une forte diminution de la quantité d'ARNm codant pour la PTH alors qu'exposées à des conditions fortement hypocalcémiques, l'augmentation d'ARNm est beaucoup moins marquée (*Barlet et al.* 1998).

Elle agit en se fixant à son récepteur par son extrémité amino-terminale. Depuis son clonage en 1991, nous savons que ce récepteur fait partie de la superfamille des récepteurs à 7 segments transmembranaires et qu'il fonctionne en activant une protéine G (*Kurbel et al.* 2003).

Le métabolisme de la PTH est complexe et produit un grand nombre de fragments présentant des activités biologiques et des propriétés immunoréactives nombreuses. Le peptide intact et biologiquement actif a une demie-vie inférieure à 4 minutes dans la circulation (*Brown* 2000). Il est rapidement éliminé par les reins et dégradé par le foie ainsi que par les cellules parathyroïdiennes elles-mêmes. Les cellules hépatiques de Kupffer sont capables de le cliver en peptides beaucoup plus petits et relargués dans le flux sanguin. Du fait de la fixation de la PTH à son récepteur par l'intermédiaire de son extrémité N terminale, il était communément admis jusqu'en 1995 que les fragments C terminaux n'avaient pas ou peu d'effets biologiques. Depuis, de fortes présomptions existent quant à l'existence d'un autre type de récepteur à la PTH susceptible d'être activé par la région C-terminale de l'hormone, voire même la partie centrale (*Brown* 1982). L'existence de ces nombreux fragments potentiellement actifs complique de façon importante la mise au point de tests fiables visant à la titration de la PTH dans le sang.

En marge de la PTH et de ses fragments, mentionnons l'existence de PTH-rP (PTH-related peptide) qui a été détecté pour la première fois dans des tumeurs pulmonaires, mammaires et rénales (*Russell et al.* 1983). Il est aussi produit par l'os sous l'influence de facteurs tels que le TGF $\beta$ . C'est un peptide de 141 acides aminés qui partage une grande homologie de séquence avec la PTH pour les 13 premiers acides aminés. Il se fixe au récepteur à la PTH et peut donc mimer les effets biologiques de la PTH notamment au niveau des os, de l'intestin et des reins. Il stimule la résorption ostéoclastique osseuse et active la réabsorption calcique

tubulaire rénale aux mêmes concentrations que la PTH native. PTH-rP n'a probablement pas d'effet sur l'homéostasie calcique dans les conditions physiologiques mais pourrait jouer le rôle de la PTH normale chez le fœtus. Notre équipe a en effet eu l'occasion de détecter une concentration anormale de PTH-rP chez un nouveau né présentant une hypercalcémie néonatale (*Brunette et al. 1995*). PTH-rP est produit par les cellules de l'épiderme ainsi que par les cellules amniotiques. Ainsi, il aurait un rôle important au niveau embryonnaire puisque notre laboratoire a démontré qu'il était capable de modifier la composition lipidique des membranes apicales des cellules placentaires. PTH-rP y augmente la concentration en phosphatidyl inositol (*Lafond et al. 1993*). Il pourrait aussi avoir des effets sur la réplication des cellules épithéliales et sur la contraction des muscles lisses. Il est en outre exprimé par les cellules des acini lactés et se retrouve donc en grande quantité dans le lait.

La PTH agit sur trois plans : l'os, le rein et indirectement sur la réabsorption intestinale.

#### 1.2.1.1 Effets de la PTH sur les os.

La PTH agit directement sur les ostéoblastes en inhibant leur activité de synthèse d'hydroxyapatite. Elle provoque dans le même temps une augmentation de l'activité ostéolytique des ostéoclastes (synthèse accrue d'enzymes lysosomiales), accélérant la résorption osseuse. Ce faisant, la PTH permet donc la mobilisation rapide du calcium osseux vers le fluide extracellulaire puis vers la circulation. L'activité phosphatase alcaline est augmentée conduisant à une augmentation de l'excrétion d'hydroxyproline ce qui constitue un marqueur important d'un remodelage osseux accéléré. Il est important aussi dans le diagnostic de l'hyperparathyroïdisme primaire.

#### 1.2.1.2 Effets de la PTH sur les reins.

Les récepteurs à la PTH sont distribués dans les segments proximaux et distaux du néphron. Au niveau distal, après la fixation de l'hormone, le récepteur active l'adénylate cyclase intracellulaire qui synthétise une quantité accrue d'AMPc. Notons que l'excrétion d'AMPc est un marqueur clinique de l'activité de la PTH (*Brunette et al.* 1979). L'effet principal se traduit par une augmentation de la réabsorption calcique. Dans le segment large ascendant de l'anse de Henlé, la PTH peut augmenter le gradient électrochimique transmembranaire, augmentant d'autant le transport passif de calcium dans ce segment. Dans la partie granulaire du tubule contourné distal ensuite, la PTH peut promouvoir la translocation sur la membrane apicale de canaux calciques néoformés. Dans le tubule collecteur enfin, elle augmente l'activité des échangeurs  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ .

La PTH inhibe la réabsorption du phosphate. Elle inhibe le transport de phosphate sodium-dépendant dans les tubules contournés proximaux (*Brunette et al.* 1973). De même, la réabsorption du bicarbonate est inhibée dans le tubule proximal provoquant une alcalinisation de l'urine. Chez les patients souffrant d'hyperparathyroïdisme primaire, la sécrétion trop importante de PTH conduit à une acidose tubulaire rénale.

La PTH diminue aussi la réabsorption de l'eau, augmentant ainsi le débit urinaire. En effet, la diminution de réabsorption sodique dans le tubule contourné proximal conduit à une charge tubulaire en sodium augmentée dans le distal. Ceci provoque donc un appel d'eau vers le compartiment tubulaire et une augmentation de la diurèse.

#### 1.2.1.3 Effets de la PTH sur le système digestif.

La PTH n'affecte pas directement la réabsorption calcique gastro-intestinale. Ces effets sont médiés par la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  dont elle favorise la synthèse dans le rein comme nous le verrons un peu plus bas.

### 1.2.2 La calcitonine

La calcitonine est une hormone polypeptidique constituée de 32 acides aminés, comportant un cycle réalisé par un pont disulfure entre les molécules de cystéine situées en 1 et 7. Elle est sécrétée par les cellules parafolliculaires C de la glande thyroïde.

Les séquences codantes pour la calcitonine comportent deux gènes :  $\alpha$  et  $\beta$ , localisés tous les deux sur le chromosome 11 (*Kittur et al.* 1985).  $\alpha$  comporte 6 exons parmi lesquels les 3 premiers sont partagés avec CGRP (calcitonin gene-related peptide). CGRP est un produit de l'épissage alternatif des transcrits issus de  $\alpha$ . C'est un neuropeptide qui possède des propriétés vasodilatatrices. Le gène  $\beta$  est organisé de façon similaire mais n'est capable de coder que CGRP. Ce peptide, formé de 37 acides aminés, a une structure chimique apparentée à celle de la calcitonine et de l'amyline. Il est présent dans de nombreux tissus, glande thyroïde, système nerveux central, oreillette, et dans le plasma sanguin où sa concentration physiologique est très basse mais s'élève lors de certaines tumeurs endocrines. Le CGRP est un très puissant vasodilatateur général, agissant particulièrement au niveau du corps caverneux et des coronaires. Il a un effet cardiaque inotrope et chronotrope positifs. Il inhibe la sécrétion gastrique et a des effets complexes sur la libération d'insuline et de glucagon.

La régulation de l'expression de la calcitonine est un sujet très étudié. Le promoteur possède une séquence lui permettant de répondre négativement à la stimulation de la vitamine D. Il comporte aussi une séquence reconnaissant AMPc (*Monla et al.* 1995). Après la transcription et l'épissage alternatif conduisant à la calcitonine ou à CGRP, ces deux peptides sont synthétisés d'abord sous la forme de grands précurseurs inactifs qui seront ensuite clivés à l'intérieur de la cellule juste avant leur libération dans la circulation.

La sécrétion de la calcitonine est déclenchée par l'augmentation de la calcémie. Elle va principalement agir sur l'os en permettant une fixation accrue des

ions  $\text{Ca}^{2+}$  dans ce tissu, participant donc à sa protection contre les pathologies ostéolytiques par exemple. La calcitonine agit aussi sur la réabsorption calcique rénale.

#### 1.2.2.1 Effets de la calcitonine sur le tissu osseux.

La calcitonine inhibe la résorption osseuse. Elle provoque une disparition rapide de la bordure en brosse des ostéoclastes (*Chambers and Magnus* 1982). La motilité cytoplasmique est réduite ce qui provoque la rétraction progressive des pseudopodes nécessaire à l'activité ostéolytique (*Chambers* 1982). La calcitonine inhibe aussi l'activité sécrétrice des ostéoclastes, et notamment celle concernant la TRAP (tartrate resistant acid phosphatase) (*Yumita et al.* 1991). La production d'acide est également atténuée puisque l'hormone agit sur la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase et sur la  $\text{H}^+$  ATPase de la bordure en brosse (*Akisaka and Gay* 1986).

Dans certains modèles, la calcitonine peut agir sur les ostéoblastes même si la présence de ses récepteurs dans ce type de cellule est toujours controversée. Son action serait anabolique, favorisant l'ostéoinduction BMP-2 (bone matrix protein 2) dépendante.

#### 1.2.2.2 Effets de la calcitonine sur le rein.

L'administration de calcitonine à des animaux chez lesquels on mesure la calciurie produit des résultats contradictoires selon le modèle étudié. Par exemple, pour le rat et le lapin, la quantité de calcium excrétée diminue (*Aldred et al.* 1970) (*Sorensen et al.* 1972) mais des facteurs tels que la concentration hormonale ou sodique peuvent moduler la calciurie en présence de calcitonine. Des expériences *in vitro* et *in vivo* ont montré que l'augmentation de la réabsorption calcique était détectable au début du tubule contourné distal et également dans la partie large de la branche ascendante de l'anse de Henlé (*Quamme* 1980).

Notre laboratoire a étudié en 1997 les effets de la calcitonine sur le transport de calcium par les membranes luminales et basolatérales du néphron de lapin (*Zuo et al.* 1997). (figure 2)

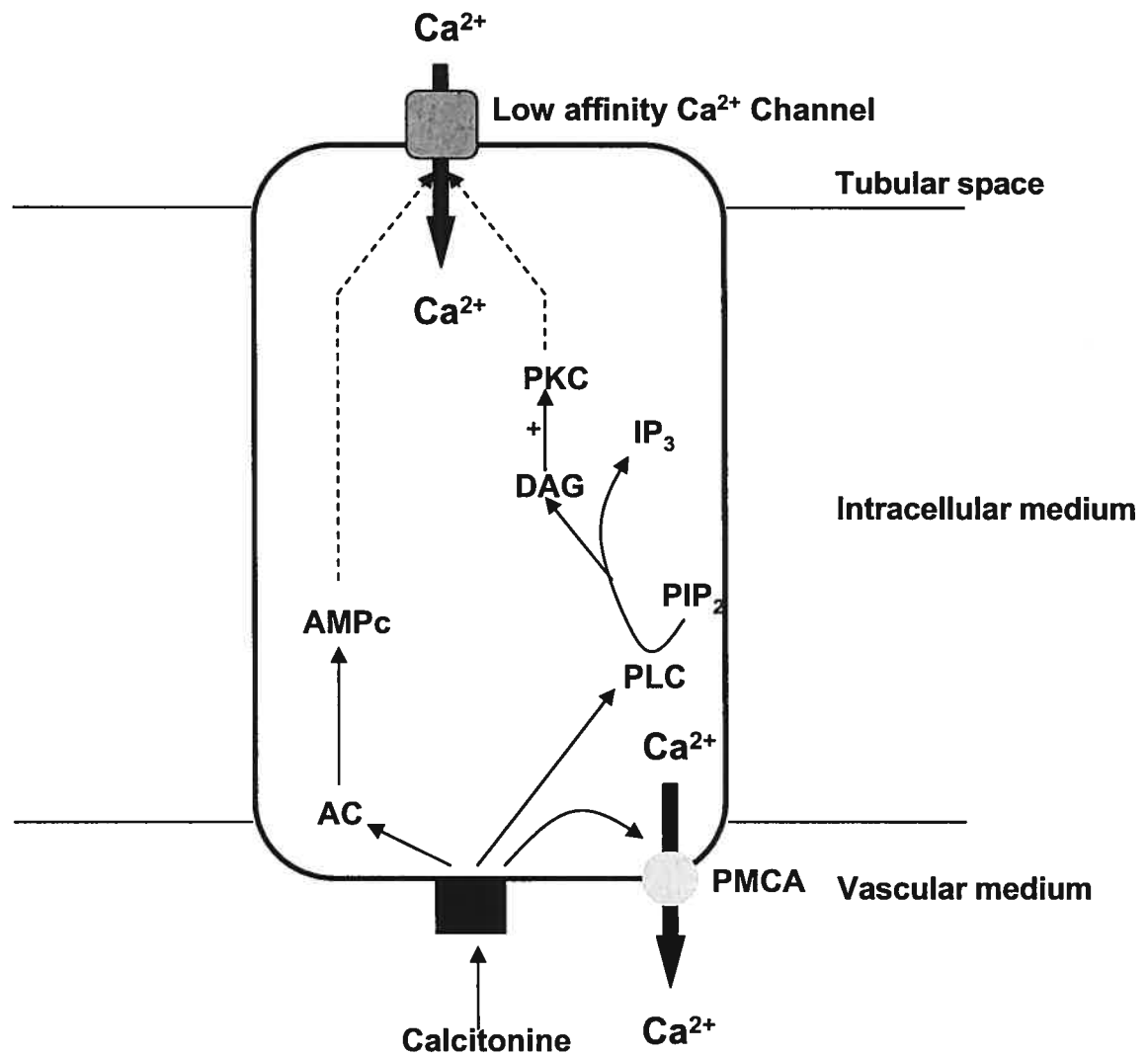


Figure 2 : effets de la calcitonine sur le segment distal du néphron de lapin

Les résultats montrent que l'hormone, à concentration supraphysiologique, ouvre des canaux calciques de basse affinité, différents de ceux activés par la PTH, au niveau des membranes lumineales du tubule distal. Elle agit en activant l'adénylate cyclase mais aussi la phospholipase C puisque la quantité d' $\text{IP}_3$  présent dans la cellule augmente en présence de calcitonine. Concernant les transporteurs actifs de la membrane basolatérale, nous avons aussi montré que la calcitonine agissait préférentiellement sur la pompe à calcium plutôt que sur l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . En revanche, l'hormone est inactive sur les cellules du PCT, confirmant ainsi l'absence de ses récepteurs dans ce secteur du néphron (Sexton et al. 1987) (Firsov et al. 1995).



### 1.2.3 La vitamine D

La vitamine D est une pro hormone stéroïde. Elle est formée à partir du 7-déhydrocholestérol dont la structure est modifiée par l'action des rayons ultraviolets de la lumière solaire. Ainsi est formé le cholécalciférol ou vitamine D<sub>3</sub>. Elle est aussi absorbée par l'organisme au niveau intestinal à partir de sources alimentaires variées. Le cholécalciférol est ensuite transporté dans le sang par une globuline spécifique jusqu'au foie où elle est hydroxylée en position 25 par la vitamine D<sub>3</sub> 25 hydroxylase située dans le réticulum endoplasmique des hépatocytes. Cette réaction nécessite la présence de NADPH, de Mg<sup>2+</sup> et d'oxygène moléculaire, de cytochrome P450 et d'une cytochrome P450 réductase. Cette réaction n'est pas contrôlée et peut aussi s'effectuer dans les reins et l'intestin mais avec moins d'efficacité. La 25 hydroxyvitamine D<sub>3</sub> est la forme principale de vitamine D circulante, associée à la protéine de liaison de la vitamine D et peut être stockée dans le foie.

Dans les tubules rénaux proximaux, une enzyme mitochondriale, la 25-hydroxy D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -hydroxylase, permet la synthèse de la 1,25-dihydroxyvitamine D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>). Dans les reins, ce processus a lieu dans les mitochondries des cellules du tubule contourné proximal (*Brunette et al.* 1978). C'est une réaction monooxygénasique complexe à trois constituants qui nécessite du NADPH, du Mg<sup>2+</sup>, de l'oxygène moléculaire et au moins trois enzymes : une flavoprotéine, (la ferrédoxine réductase rénale), la ferrédoxine rénale (protéine contenant du soufre et du fer), et le cytochrome P450. Ces étapes sont indispensables pour que la molécule acquière son activité biologique et donne naissance au métabolite le plus puissant de la vitamine D.

Le placenta, qui possède aussi une 1 $\alpha$  hydroxylase est une source extra-rénale importante de calcitriol. De même, cette synthèse a aussi été détectée dans les os mais son importance physiologique n'apparaît pas primordiale puisque le

taux de calcitriol sanguin relevé chez des lapins femelles néphrectomisés est très faible.

Sachant que le taux de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  est important dans la régulation de la calcémie, le catabolisme de cette hormone est crucial dans le fonctionnement de l'hormone. La dégradation du calcitriol se fait principalement par l'oxydation de la chaîne latérale par une enzyme spécifique, la vitamine D-24-hydroxylase, dont le fonctionnement nécessite aussi la présence du cytochrome P450 et de la ferrédoxine réduite. La réaction est initiée au niveau du carbone 24 puis progresse vers le carbone 23, aboutissant au clivage oxydatif de la chaîne latérale, chaque étape réduisant d'autant l'activité biologique de la molécule. (*Makin et al.* 1989). La vitamine D-24-hydroxylase est présente dans tous les tissus cibles du calcitriol et sa synthèse est stimulée par la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . D'autres métabolites ont été décrits. Parmi eux, le  $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ -23,26-lactone a montré une activité anti calcitriol capable d'inhiber la fusion dépendante de la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  de cellules mononuclées de moëlle osseuse (*Ishizuka et al.* 1988).

La production de calcitriol est donc contrôlée par la PTH mais aussi par sa propre concentration et par la concentration de phosphate sérique.

#### 1.2.3.1 Régulation par la PTH

L'hypocalcémie augmente la concentration sérique en  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  en stimulant l'activité de la  $1\alpha$ -hydroxylase. Une ablation de la glande parathyroïde diminue fortement l'activation de la 25-hydroxy  $\text{D}_3$   $1\alpha$ -hydroxylase rénale (*Garabedian et al.* 1972). Les effets de la PTH se font directement sur les cellules tubulaires proximales et sont médiés par l'AMPc pour aboutir à une stimulation de la transcription du gène codant pour la  $1\alpha$ -hydroxylase (*Murayama et al.* 1998). En parallèle, la PTH diminue l'activité de la vitamine D-24-hydroxylase et donc ralentit le processus de dégradation du calcitriol.

### 1.2.3.2 Régulation par le calcium

Lorsque des rats subissent une ablation de la glande parathyroïde et sont supplémentés de façon continue avec de la PTH (pour empêcher l'hyperphosphatémie qui peut diminuer la concentration sanguine de calcitriol), le taux de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  détecté diminue lorsque la calcémie est augmentée par perfusion de chlorure de calcium. Au contraire, si les rats reçoivent de l'EGTA, la concentration en  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  augmente (*Matsumoto et al.* 1987). Donc, lorsque la concentration en PTH et la phosphatémie sont maintenus constants, on observe quand même une corrélation inverse entre la calcémie et la concentration sérique de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . L'activité ou la transcription du gène de la 25-hydroxy  $\text{D}_3$   $1\alpha$ -hydroxylase pourrait donc être directement supprimée par le calcium.

### 1.2.3.3 Régulation par le pH

Une acidose métabolique est susceptible de perturber les effets de la PTH sur l'activité de la  $1\alpha$ -hydroxylase (*Kawashima et al.* 1982). Ce phénomène s'explique par une plus grande difficulté pour les récepteurs à la PTH à se coupler avec l'adénylate cyclase, dont le produit, l'AMPc, est nécessaire à l'activation de la transcription du gène de la 25-hydroxy  $\text{D}_3$   $1\alpha$ -hydroxylase. La diminution du pH sanguin produit aussi une augmentation du calcium ionisé. Il est possible que ces ions  $\text{Ca}^{2+}$  supplémentaires perturbent le métabolisme de la vitamine D puisque l'EGTA est capable de bloquer les effets de l'acidose sur le calcitriol, sans changer le pH sanguin (*Bushinsky et al.* 1985).

### 1.2.3.4 Régulation par les ions phosphate

L'importance du phosphate dans la régulation de la production de calcitriol est bien établie. Un régime pauvre en phosphate augmente la concentration sanguine de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Le mécanisme impliqué semble être PTH et calcium indépendant. Les ions phosphates agissent au niveau des ARNm codant pour la 25-hydroxy  $\text{D}_3$   $1\alpha$ -hydroxylase, mais n'augmentent pas son activité comme certains auteurs l'avaient imaginé auparavant (*Hughes et al.* 1975). La vitamine D-

24-hydroxylase quant à elle est aussi régulée par le phosphate, mais de façon inverse, toujours au niveau des ARNm. Son expression diminue modérément à mesure que la quantité d'ion phosphate diminue dans l'alimentation (*Wu et al.* 1996).

#### 1.2.3.5 Régulation par l'insuline et IGF-1 (insulin-like growth factor 1).

Chez le rat, lorsqu'une hypophysectomie est réalisée, l'effet stimulateur d'un régime carencé en phosphate sur la synthèse de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  disparaît (*Gray et al.* 1983). Or, l'insuline et un de ses facteurs dérivés, l'IGF-1, sont capables de stimuler l'action de la PTH notamment sur l'activité de la 25-hydroxy  $\text{D}_3$   $1\alpha$ -hydroxylase *in vitro* (*Armbrecht et al.* 1996). *In vivo*, chez des rats diabétiques, la formation de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  est fortement diminuée (*Wongsurawat and Armbrecht* 1985)

#### 1.2.3.6 Régulation par la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

Le rétrocontrôle de la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  sur sa propre synthèse est aussi un élément important contribuant à éviter les risques d'intoxication à la vitamine D. Chez les animaux déficients en  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , l'activité 25-hydroxy  $\text{D}_3$   $1\alpha$ -hydroxylase est maximale alors que celle de la vitamine D-24-hydroxylase est indétectable. Un traitement à la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  renverse complètement ce tableau. Ces résultats ont aussi été reproduits sur des cellules de rein en culture, indiquant que les effets de la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  sont directs. Contrairement aux ions phosphate ou  $\text{Ca}^{2+}$ , le rétrocontrôle se fait grâce à un mécanisme génomique et non pas au niveau des ARNm. Le gène codant pour la vitamine D-24-hydroxylase comporte au moins deux régions capables de fixer  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  liée à son récepteur en amont de son promoteur (*Chen and Deluca* 1995). Il semble donc que lorsque l'absorption de calcium et de phosphore est normale, le rétrocontrôle est le mécanisme de régulation primaire du taux circulant de calcitriol.

### 1.2.3.7 le récepteur de la vitamine D (VDR)

La plupart des effets biologiques de la vitamine D sont médiés par un récepteur à haute affinité comme un facteur de transcription ligand activable. Comme les autres récepteur de la famille des récepteurs aux stéroïdes, son fonctionnement nécessite 1) la fixation du ligand, 2) sa dimérisation (ici, avec le récepteur de l'acide rétinoïque, RXR), 3) la fixation des hétérodimères à des séquences particulières des gènes régulés (les vitamin D response elements, VDRE), et 4) le recrutement d'autres protéines nucléaires dans le complexe initiant la transcription. Un certain nombre de VDRE ont été caractérisés dans le promoteur des gènes sous la dépendance de la vitamine D : PTH humaine et aviaire, ostéocalcine murine, PTH-rp et sialoprotéine osseuse chez le rat.

### 1. 2.3.8 Actions biologiques de la vitamine D

#### *A L'intestin*

La  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  augmente l'efficacité de l'intestin grêle pour la réabsorption du calcium, comme démontré dans une étude utilisant des souris VDR knock-out (*Li et al.* 1998). L'hormone stimule l'entrée de calcium à travers la membrane luminale des entérocytes, le transport de calcium à travers le cytoplasme et le transfert à travers la membrane basolatérale vers la circulation. La  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  agit par l'intermédiaire de la calbindine D, et par l'activation de la  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase basolatérale. D'autre part, le calcitriol semble pouvoir agir rapidement, c'est-à-dire de façon non génomique, aussi bien dans le transport transcellulaire que paracellulaire du calcium. En marge de son action sur le calcium, il faut noter que la vitamine D stimule l'expression du transporteur  $\text{Na}^+/\text{Pi}$  (NPT2a) (*Yagci et al.* 1992).

#### *B Le squelette*

Une carence en vitamine D se traduit par du rachitisme chez l'enfant alors que les adultes développent de l'ostéomalacie.  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  induit la formation osseuse en stimulant la production des protéines de la matrice osseuse et en activant l'apposition minérale en augmentant la calcémie et la phosphatémie.

En outre,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  maintient la calcémie en favorisant l'activité ostéoclastique. Cependant, pour agir, il semble que la présence des ostéoblastes soit nécessaire, comme démontré dans une étude portant sur les potentialités de résorption osseuse du calcitriol et où des ostéoblastes doivent être mis en culture en même temps que les ostéoclastes pour observer un effet (*Li et al.* 1998).

### *C Les glandes parathyroïdes*

Alors que la PTH est l'hormone principale impliquée dans la régulation à court terme de la calcémie, la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  joue un rôle clé à moyen terme. La PTH stimule la production de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  en activant la 25-hydroxy  $\text{D}_3$   $1\alpha$ -hydroxylase et en retour, le calcitriol exerce un contrôle négatif sur la synthèse et sur la sécrétion de la PTH, ainsi que sur la croissance des cellules parathyroïdiennes (*Szabo et al.* 1989). Une carence en vitamine D entraînera donc une hyperplasie parathyroïdienne. Le contrôle de la synthèse de PTH par  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  se fait au niveau de la transcription, des séquences VDRE étant présentes dans le promoteur du gène de la PTH.

### *D Le rein*

Tout d'abord, comme évoqué plus haut, le calcitriol est capable de stimuler l'activité de la  $24\alpha$ -hydroxylase et d'inhiber le fonctionnement de la 25-hydroxy  $\text{D}_3$   $1\alpha$ -hydroxylase au niveau des cellules tubulaires proximales de façon à assurer un rétrocontrôle négatif sur sa propre synthèse.

Au niveau de la réabsorption du calcium par les cellules tubulaires rénales, des études in vivo et in vitro ont montré que la vitamine D était susceptible d'augmenter le transport de calcium. Ainsi en 1984 l'équipe d'Ogata (*Yamamoto et al.* 1984) montra que  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  stimulait la réabsorption du calcium chez le rat tout en sensibilisant les tubules rénaux aux effets de la PTH. Un peu plus tard, en 1991, (*Bindels et al.* 1991) montrèrent que le calcitriol augmentait l'expression des calbindines. Notre laboratoire s'est aussi intéressé à la vitamine D. Lorsque nous avons comparé la réabsorption calcique entre deux groupes de lapins (contrôle vs

régime sans vitamine D durant 3 semaines), nous avons montré une diminution de 40% de la réabsorption calcique par les membranes basolatérales et de 50% par les membranes apicales des cellules distales des lapins carencés. A l'inverse, aucun effet n'avait pu être détecté au niveau du tubule proximal (*Bouhtiauy et al.* 1993). En 1994, nous avons précisé le mécanisme par lequel la vitamine D agit sur les tubules rénaux en mettant en évidence la synthèse et le rôle prépondérant de la calbindine 28K pour la membrane luminale du tubule distal (*Bouhtiauy et al.* 1994a) et celui non moins important de la calbindine 9K pour l'activation des pompes calciques ( $\text{Ca}^{2+}$  ATPases) des membranes basolatérales des cellules proximales et distales (*Bouhtiauy et al.* 1994b).

### **1.3 Les épithéliums de réabsorption du calcium.**

La régulation de la concentration calcique extracellulaire est d'une très grande importance pour un certain nombre de fonctions vitales du corps. Confronté à de larges variations d'entrée et/ou de sortie de calcium, l'organisme dispose d'une panoplie de systèmes régulateurs destinés à maintenir une concentration calcique plasmatique d'environ 2,5 mM. Ceci est réalisé en contrôlant étroitement les flux entre le compartiment extracellulaire et des organes tels que les reins, le squelette ou encore l'intestin.

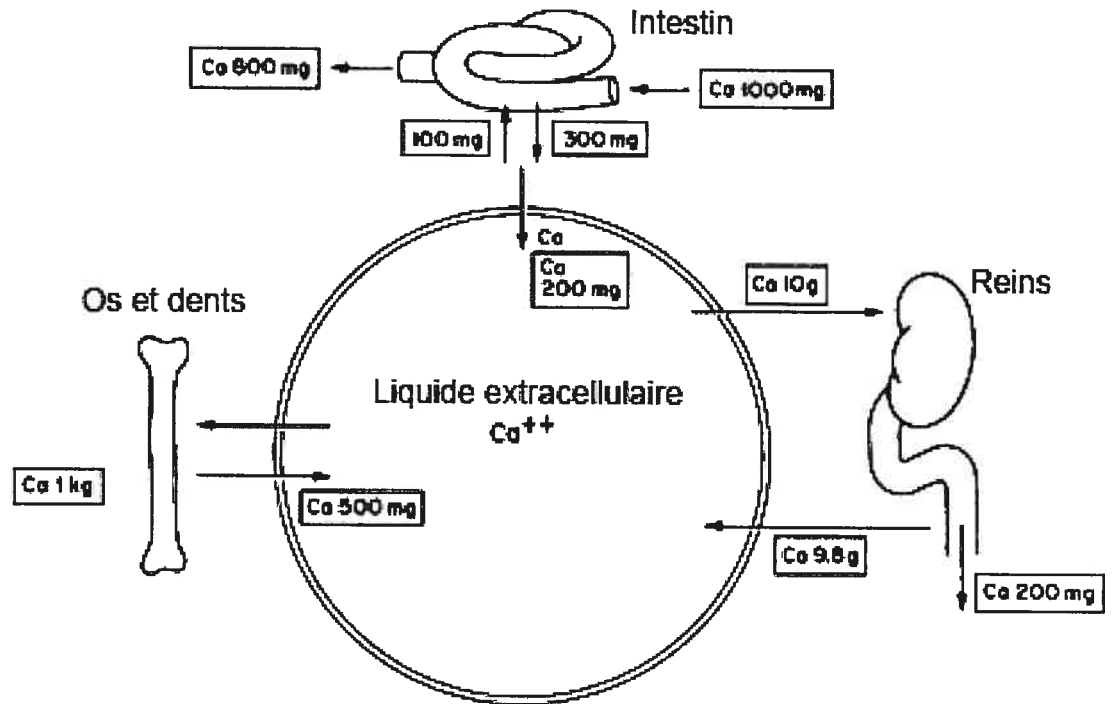


Figure 3: Flux journaliers entre les différents compartiments de l'organisme impliqués dans la régulation du calcium absorbé.

Le transport calcique s'effectue dans les tissus épithéliaux, notamment l'intestin, le placenta et les reins. Environ 10 g de calcium sont filtrés par jour au niveau du glomérule et moins de 2% de ce calcium sont ensuite excrétés dans l'urine (Figure 3). Ceci sous-entend donc une réabsorption massive des ions  $\text{Ca}^{2+}$  lorsqu'ils cheminent à travers les différents segments du néphron. Deux processus différents sont impliqués dans ce phénomène : le transport para-cellulaire passif et le transport trans-cellulaire actif. La voie para-cellulaire permet l'échange direct de calcium entre le compartiment luminal et le compartiment extracellulaire, alors que le mode trans-cellulaire implique de faire passer les ions à travers au moins deux membranes cellulaires.

De nombreuses méthodes ont été utilisées pour étudier la réabsorption du calcium : microponctions, techniques utilisant des traceurs radioactifs, microdissections. Plus récemment, des cultures primaires de cellules épithéliales et des lignées cellulaires établies ont été utilisées pour mesurer le transport de



calcium radioactif ainsi que de marqueurs fluorescents. Enfin, les outils de biologie moléculaire ont permis d'identifier et de caractériser individuellement les protéines de transport et de développer des modèles animaux importants pour préciser les voies impliquées.

Parmi les structures importantes dans la réabsorption épithéliale du calcium, les canaux calciques tiennent une place prépondérante. Leur classification, leur structure et leur fonctionnement font toujours l'objet d'études intensives.

### *1.3.1 Les canaux calciques voltages dépendants.*

#### *1.3.1.1 Structure générale.*

Les études électrophysiologiques sur les neurones ont montré plusieurs types de courants calciques qui ont été désignés courants de type L, N, P, Q et T. Cette classification est basée sur le seuil d'activation des canaux. On distingue donc d'abord les canaux activés par une dépolarisation élevée : ce sont les HVA (high voltage activated). On place dans cette catégorie les canaux de type L, N, P et Q. Le deuxième groupe est formé par les canaux dits LVA (low voltage activation) dont le représentant principal est le type T. Les canaux calciques voltage dépendants sont des complexes moléculaires formés par une sous-unité  $\alpha_1$  d'environ 190-250 kDa associée avec deux sous-unités  $\gamma$  et  $\delta$  en position transmembranaire.  $\beta$  se lie à  $\alpha_1$  en position intracellulaire alors que  $\alpha_2$ , extracellulaire, est rattachée à  $\delta$  par un pont disulfure.

#### *A Sous-unité $\alpha_1$ .*

C'est la sous-unité responsable de la sensibilité des canaux au voltage membranaire. C'est aussi elle qui détermine la spécificité du canal pour le calcium. Elle est composée de 4 domaines répétés (I-IV). Chacun de ces domaines présente 6 hélices  $\alpha$  trans-membranaires notées S1 à S6. S4 est chargé positivement et joue le rôle du 'voltage sensor'. Le pore à proprement parler se trouve entre les régions S5

et S6 de chaque domaine. Ces régions ne sont pas glycosylées. 10 isoformes de  $\alpha$ -1 ont à ce jour été identifiées et clonées. Il s'agit d'  $\alpha$ -1 A, B, C, D, E, F G, H, I et S. Ils sont codés respectivement par les gènes CACNA1A, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 1G, 1H, 1I et 1S (*Rottbauer et al.* 2001).

#### *B Sous-unité $\alpha$ -2 et $\delta$*

Elles dérivent du même gène (CACNA2D1) et sont très fortement glycosylées sur leur partie extra-cellulaire. Leur taille est d'environ 140-170 kDa et elles sont importantes pour le fonctionnement du canal puisque responsables de l'amplitude des courants calciques.

#### *C Sous-unité $\beta$*

Elle fait environ 52 à 78 kDa et est codée par CACNAB. Elle existe aussi sous plusieurs isoformes et possède des sites de phosphorylation qui pourraient lui permettre de modifier les cinétiques d'activation et d'inactivation des canaux.

#### *D Sous-unité $\gamma$*

Cette sous-unité n'a pas de domaine cytoplasmique et pèse environ 32kDa. Elle est codée par CACNG1 à 8 (8 isoformes). Elle est aussi impliquée dans la régulation des canaux en permettant notamment l'activation dans des membranes hyperpolarisées.

#### 1.3.1.2 Les canaux calciques de type L

Ces canaux ont été appelés 'L' pour 'long lasting'. Ils sont activés par de fortes dépolarisations et deviennent inactifs lorsque le potentiel membranaire diminue. Ils sont présents dans le muscle squelettique ( $\alpha$ -1S), le cerveau (corps cellulaire des neurones et dendrites,  $\alpha$ -1D), le muscle cardiaque ( $\alpha$ -1C), la rétine ( $\alpha$ -1F) ou encore le rein où  $\alpha$ -1C a été localisée sur les membranes apicales de

cellules de tubules distaux en culture (Zhao et al. 2002a). Les canaux de type L ne sont pas impliqués dans la transmission synaptique mais peuvent jouer un rôle important pour la transcription. (Murphy et al. 1991) ont par exemple démontré que l'expression de c-fos et c-myc dans le neurone se faisait par un mécanisme calcium dépendant et que les canaux de type L en étaient les médiateurs principaux. De même, l'influx de calcium (en tant que second messenger) issu des canaux L apparaît être plus efficace dans la transcription de Creb (cAMP response element binding protein) que toute autre source de calcium (Bading et al. 1993).

Pharmacologiquement, ces canaux sont bien caractérisés. Ils sont tout d'abord sensibles aux dihydropyridines. Ces molécules se fixent sur  $\alpha$ -1 pour bloquer le courant ionique. Ils sont aussi inhibés par les phenylalkylamines (vérapamil), les benzothiazépines (diltiazem) et la calciseptine.

#### 1.3.1.3 Les Canaux de type N

Ces canaux ont initialement été découverts dans les neurones. Ils comportent généralement les sous-unités  $\alpha$ -1B,  $\alpha$ -2,  $\delta$  et  $\beta$ -1B. Ils sont activables par une forte dépolarisation mais leur inactivation est lente. Ils sont particulièrement présents sur les membranes pré-synaptiques. Cette localisation implique donc qu'ils participent à l'exocytose des vésicules synaptiques. Ce rôle est très probable depuis que nous savons que la boucle intracellulaire entre les segments 5 et 6 de  $\alpha$ -1A et  $\alpha$ -1B est capable de se fixer aux protéines de fusion présentes sur la membrane des vésicules (Chapman and Jahn 1994). Les types N sont plus importants dans la transmission synaptique périphérique que dans le système nerveux central où le type P/Q domine.

Ils sont inhibés par des toxines peptidiques issues de venins. Parmi ceux-ci, on peut citer : la calcicludine qui n'est pas spécifique puisqu'elle agit aussi sur les types L et P. Le type N est sensible à plusieurs conotoxines :  $\omega$ -Conotoxin GVIA (*Conus geographus*),  $\omega$ -Conotoxin MVIIA (*Conus magus*), et l'  $\omega$ -Conotoxin SVIB (*Conus striatus*). On peut aussi citer le sulfate de néomycine.

#### 1.3.1.4 Les canaux de type P/Q

Ces deux catégories de canaux sont souvent décrites en même temps puisqu'elles partagent les même sous-unités :  $\alpha$ -1A,  $\alpha$ -2,  $\delta$  et  $\beta$ -4A. Ces deux types de canaux sont activés par une forte dépolarisation et ont une inactivation lente. Les canaux de type P sont principalement présents dans les cellules de Purkinje du cervelet et dans les jonctions neuro-musculaires et dans le tubule distal (*Brunette et al.* 2004). Comme les N, ils agissent dans le cadre de la libération des neurotransmetteurs. Il sont inhibés par l' $\omega$ -Agatoxin IVA (*Agelenopsis aperta*) et FTX-3.3 (*Agelenopsis aperta*). Ces deux toxines sont extraites du venin d'une araignée.

Les canaux Q sont quand à eux sensibles à l' $\omega$ -Conotoxin MVIIC (*Conus magus*). Cette toxine est néanmoins peu spécifique puisqu'elle bloque aussi les types N et P.

#### 1.3.1.5 Les canaux de type T

L'existence de canaux calciques activés par de faibles dépolarisations membranaires (low voltage activated, LVA) a été suggérée il y a plus de 20 ans pour expliquer l'activité rythmique déclenchée dans les neurones thalamiques à la suite de leur hyperpolarisation. Cette situation paradoxale d'activité électrique recrutée par l'hyperpolarisation membranaire dans certains neurones semblait s'expliquer par l'existence de canaux calciques partiellement inactivés dans la gamme du potentiel de repos mais dont l'activation était à nouveau permise par l'hyperpolarisation transitoire de ces neurones.

Les techniques de patch-clamp ont permis d'identifier des courants transitoires (type T) dans de très nombreux types cellulaires comme les neurones, les myocytes cardiaques, les cellules musculaires squelettiques et vasculaires, ou encore dans les cellules sécrétrices (corticosurrenales, cellules  $\beta$  du pancréas). La deuxième étape fut l'identification des sous-unités impliquées.  $\alpha$ -1G, 1H et 1I sont les trois isoformes détectés dans les canaux de type T. Elles sont aussi appelées  $CA_v3.1$ ,  $CA_v3.2$  et  $CA_v3.3$ , respectivement. Ces sous-unités sont codées par les gènes CACNA1G, CACNA1H et CACNA1I, localisés sur les chromosomes 17, 16 et 22.

Les ARNm de ces trois protéines ont été mis en évidence en très forte quantité dans le système nerveux central. Au niveau périphérique,  $\alpha$ -1H est majoritaire dans le rein (Cribbs *et al.* 1998) et dans les tissus sécréteurs.  $\alpha$ -1G se trouve surtout dans le cœur, les ovaires, le placenta (Monteil *et al.* 2000) ou encore les tissus fœtaux. Les transcrits de la sous-unité 1I sont très présents dans le SNC mais aussi dans la glande corticosurrénale et dans la thyroïde. Les trois mRNA peuvent coexister dans certaines structures du bulbe olfactif, les neurones pyramidaux et l'hippocampe (Talley *et al.* 1999).

Grâce au clonage de ces sous-unités, il a été possible de construire des canaux recombinants dans des systèmes d'expression tels que des ovocytes de xénope ou encore des cellules de mammifères. Il ressort de ces études que l'activation s'effectue avec des dépolarisations faibles (LVA) et que les canaux présentent des cinétiques d'inactivation rapide. Le rapport de perméabilité  $\text{Ca}^{2+}/\text{Ba}^{2+}$  est proche de 1 (0.5 pour les canaux HVA). La conductance est faible : 7pS (Perez-Reyes *et al.* 1998) mais, il semble qu'il existe une différence fonctionnelle en fonction de l'isoforme exprimé. Par exemple,  $\alpha$ -1I présente des cinétiques d'activation et d'inactivation 6 à 8 fois plus lentes que les autres isoformes (Lee *et al.* 1999).

La pharmacologie des canaux T est peu développée. Le mibéfradil est l'une des premières molécules reconnues comme affectant ces canaux à des concentrations inférieures à 1  $\mu\text{M}$  (Clozel *et al.* 1997). Toutefois, la séparation des canaux T (entre eux et des autres conductances) est toujours problématique. Seul l'ion nickel ( $\text{Ni}^{2+}$ ) différencie les isotypes T en bloquant les courants produits par  $\alpha$ -1H avec une  $\text{IC}_{50}$  d'environ 5  $\mu\text{M}$  alors que pour  $\alpha$ -1G et  $\alpha$ -1I elle est de 150  $\mu\text{M}$  (Lee *et al.*, 1999). Il faut cependant noter qu'une étude récente décrit l'effet de molécules présentées comme étant des bloqueurs de canaux T (valproate, phénytoïne et éthosuximide) (Lacinova *et al.* 2000).

Au niveau physiologique, ces canaux T ont montré des propriétés de courant de 'fuite' dans la gamme des potentiels de repos membranaires. (-70,-55 mv). Des expériences effectuées avec des cellules HEK-293 surexprimant  $\alpha$ -1G et  $\alpha$ -1H

mettent en évidence leur contribution à la charge calcique intracellulaire des cellules au repos (*Chemin et al.* 2000).

À ce jour, aucun mécanisme cellulaire modifiant l'activité des canaux T natifs n'a pu être mis en évidence (phosphorylations, protéine G...) Pourtant, au niveau de la glande corticosurrénale, *Lu et al.* (1996) ont montré que l'angiotensine II pouvait moduler les courants transitoires qui dépendent des protéines G. Cette observation est compatible avec le fait que les canaux LVA, tout comme les HVA, peuvent comporter des sous-unités régulatrices. Les outils nécessaires à l'identification de ces sous-unités sont en cours de développement mais il existe d'ores et déjà des indices nous permettant de penser que les sous-unités régulatrices des HVA comme les  $\beta$  par exemple, pourraient aussi modifier l'activité des canaux LVA.

#### 1.3.1.6 Les canaux de type R

L'isoforme caractéristique de la sous-unité  $\alpha$ -1 de ce groupe est  $\alpha$ -1E (*Zhang et al.* 1993). Ils sont présents dans les neurones granulaires du cervelet. Ils sont très peu connus puisqu'en 2002, des études (*Lee et al.* 2002) cherchent à confirmer l'isoforme E comme étant celui présent dans les canaux de type R. Le seul inhibiteur spécifique connu se nomme SNX-482 et est extrait du venin d'une tarentule africaine (*Hysteroecrates gigas*). De par leur distribution, ils participent sans aucun doute à la transmission synaptique, probablement en activant le relargage des neurotransmetteurs tout comme les canaux N.

#### 1.3.2 Les canaux voltage indépendants.

Ces canaux font partie de la superfamille des canaux TRP (transient receptor potential). Ils ont en commun une structure comportant 6 segments transmembranaires, une structure tétramérique et une perméabilité pour les cations monovalents ainsi que pour le  $\text{Ca}^{2+}$ . 3 sous-familles ont été décrites jusqu'à présent chez les mammifères : TRPC, TRPM et TRPV. TRPC comporte 7 isoformes, TRPM, 8 et TRPV en rassemble 6. Les 2 types de canaux ECAC se situent dans le groupe

des TRPV et peuvent donc aussi être appelés TRPV5 et TRPV6. Ils ont été clonés à partir du petit intestin et du rein et présente la plus grande sélectivité au calcium de la superfamille des TRP (*Hoenderop et al.* 1999c). Ces canaux sont surtout exprimés dans les épithéliums de transport et doivent donc jouer un rôle clef dans l'homéostasie calcique.

ECAC1 et 2 ont été clonés chez de nombreuses espèces, incluant le rat, le lapin la souris et l'humain (*Hoenderop et al.* 2002b). Tous les membres de la famille ECAC possèdent un site de phosphorylation par la PKC ce qui renforce l'hypothèse de la sensibilité de ces canaux aux hormones (*Hoenderop et al.* 1999a).

ECAC1 est préférentiellement exprimé dans le rein alors que ECAC2 est majoritaire dans l'intestin. Des analyses en RT-PCR et northern blot ont aussi détecté les transcrit ECAC dans le testicule, la prostate, l'estomac le placenta, le pancréas, le colon et le cerveau. Dans tous ces tissus, ECAC est exprimé de façon concomitante avec la calbindine D<sub>9k</sub> ou la D<sub>28k</sub> facilitant le transport de calcium. Dans le rein, (*Loffing et al.* 2001b) ont montré que l'expression des protéines ECAC se situe dans la partie distale du néphron. Leurs localisations changent à partir de la membrane apicale dans le tubule contourné distal, jusqu'au cytoplasme dans le tubule collecteur.

Les courants enregistrés dans ces canaux présentent une haute spécificité pour le calcium qui peut jouer un rôle régulateur par feedback négatif, produisant donc un courant caractérisé par une rapide inactivation (*Yue et al.* 2001). Pharmacologiquement, ECAC1 et ECAC2 peuvent être différenciés avec le rouge de ruthénium qui inactive sélectivement ECAC1.

Les canaux calciques ainsi définis, voyons quelle est leur place dans le fonctionnement des épithéliums de réabsorption rénale.

### 1.3.3 Le transport para-cellulaire passif.

L'épithélium tubulaire proximal est constitué d'une couche de cellules polarisées liées entre elles par des jonctions serrées. Ces jonctions permettent néanmoins de ménager un espace étroit entre chacune des cellules. Cet espace est suffisant pour laisser les petites molécules et les ions diffuser (*Goodenough* 1999). Ainsi se définit le transport para-cellulaire qui doit être régulé pour que l'épithélium puisse garder sa sélectivité. Des études récentes ont permis d'identifier certaines molécules impliquées dans cette voie de transport et importantes dans des pathologies rares comme que le pseudohypoaldonstéronisme de type II (*Wilson et al.* 2001). Cette maladie autosomale dominante est caractérisée par de l'hypertension déclenchée par une augmentation de la réabsorption sodique corrélée avec la baisse de l'excrétion de  $H^+$  et  $K^+$ . Ces variations seraient dûes à la présence de mutations dans les gènes codant pour les sérine-thréonine kinases de type WNK. Parmi les pathologies reliées directement au transport ionique paracellulaire, nous pouvons encore citer l'hypomagnésémie familiale (*Simon et al.* 1999) ou la surdité autosomale récessive (*Wilcox et al.* 2001).

Les jonctions serrées sont un domaine membranaire spécialisé à la partie apicale des cellules épithéliales polarisées. Elles créent d'une part une première barrière prévenant le transport para-cellulaire des solutés et d'autre part restreignent la diffusion latérale des lipides membranaires et des protéines de façon à maintenir la polarisation cellulaire. Ces structures intercellulaires permettent de maintenir très proches les membranes plasmiques de deux cellules épithéliales adjacentes. Elles sont composées de protéines membranaires de la famille des intégrines, incluant l'occludine, les claudines, et quelques membres de la superfamille des immunoglobulines (*Ebnet et al.* 2003) (*Goodenough* 1999) (*Martin-Padura et al.* 1998). La famille des claudines est le constituant majeur des jonctions serrées alors que l'occludine est une protéine accessoire dont trois isoformes ont été détectés (*Morita et al.* 1999) (figure 4)



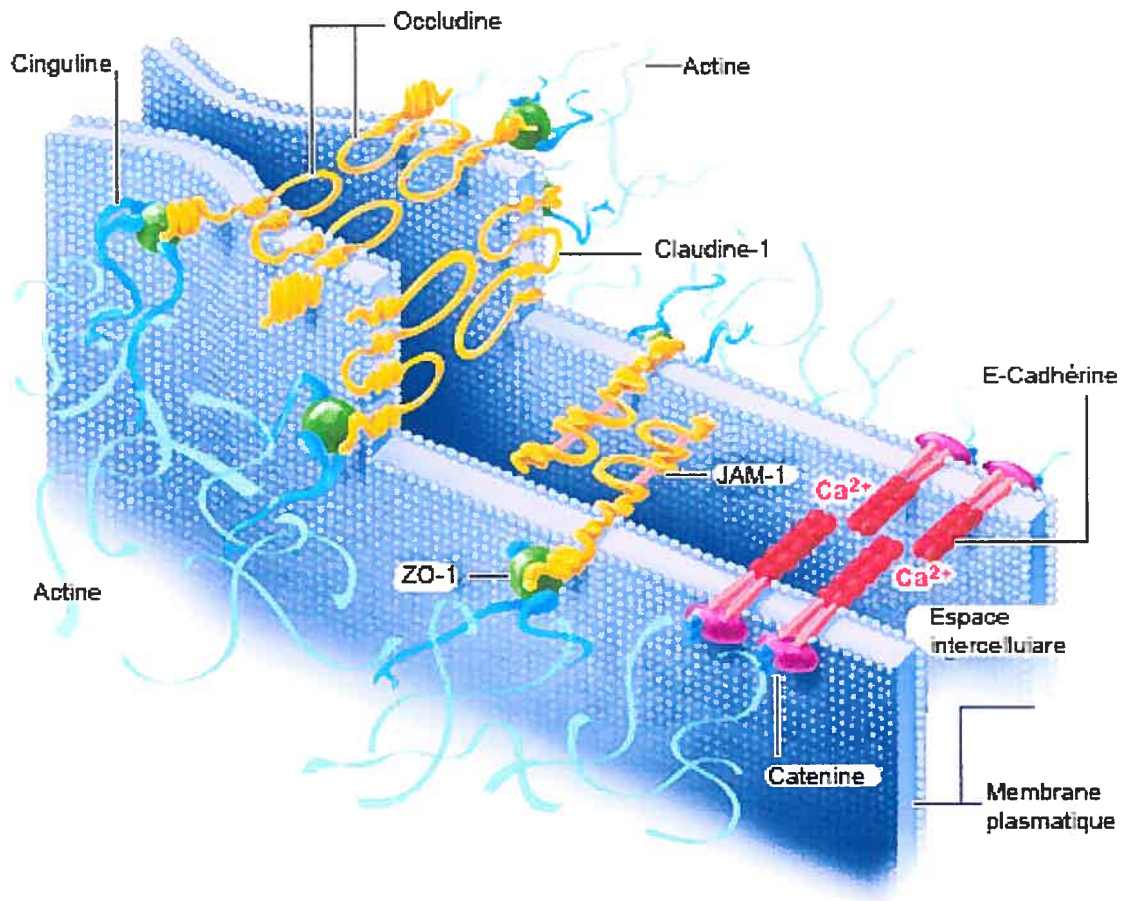


Figure 4: Détail d'une jonction serrée et de ses composantes moléculaires. D'après *Tang and Goodenough 2003*

Le fonctionnement des jonctions serrées se rapprocherait plutôt du comportement d'un canal ionique que de celui d'un canal à eau, sans sélectivité particulière (*Tsukita and Furuse 2000*). En effet, les complexes de jonction ont montré qu'ils pouvaient être sélectifs pour un ion en fonction de sa taille et de sa charge, que leur perméabilité était fonction de la concentration de l'ion considéré, qu'il existait une compétition entre molécules perméables, et qu'enfin ils étaient sensibles au pH (*Tang and Goodenough 2003*). Les hormones et autres facteurs (cytokines, toxines bactériennes, facteurs de croissance) affectant le gradient

électrochimique dans cette région du néphron régulent donc de façon indirecte le transport para-cellulaire (*Benais-Pont et al.* 2003) (*Garcia et al.* 1998). Quelques études ont même suggéré que des phosphorylations seraient impliquées dans le fonctionnement des jonctions serrées, et en particulier celles modulant l'activité de la protéine kinase C (PKC) (*Wang et al.* 2004b). En étant modulée par les MAP kinases, la PKC pourrait ouvrir les jonctions pour leur donner une plus grande perméabilité. D'ailleurs, une phosphorylation sérine thréonine dépendante a récemment été caractérisée comme étant un élément clef de l'augmentation de la perméabilité para-cellulaire dans l'épithélium nasal de lapin (*Ohtake et al.* 2003).

#### 1.3.4 Le transport trans-cellulaire actif au niveau du rein

La Réabsorption calcique trans-cellulaire est un phénomène comportant 3 étapes principales : 1) transfert du calcium dans la cellule tubulaire rénale par la membrane luminale, 2) translocation des ions  $\text{Ca}^{2+}$  vers le pôle basolatéral de la cellule et 3) extrusion du calcium vers le système circulatoire par la membrane basolatérale.

##### 1.3.4.1 L'entrée de calcium dans la cellule.

Les ions  $\text{Ca}^{2+}$  entrent dans les cellules épithéliales en empruntant des canaux calciques enchâssés dans la membrane luminale de ces cellules. Ce transport est possible grâce à la présence d'un fort gradient électrochimique de part et d'autre de la membrane. De nombreuses équipes ont cherché à comprendre et à découvrir la nature moléculaire de ces entrées de calcium dans les cellules rénales mais aussi dans les cellules intestinales et placentaires. Il ressort de ces études que plusieurs types de canaux calciques sont présents dans les membranes lumineuses des épithéliums rénaux selon le segment du néphron étudié.

Les canaux calciques de type L par exemple sont présents dans le tubule contourné distal et plus particulièrement dans les cellules exprimant la calbindine  $\text{D}_{28\text{K}}$  (*Zhao et al.* 2002b). En outre l'aldostérone est capable d'augmenter la

réabsorption calcique dans le tubule distal en agissant sur des canaux calciques de type L sensibles au diltiazem et des canaux calciques de type T inhibés par le mibéfradil (*Leclerc et al.* 2004). Ces canaux sont caractérisés par respectivement une forte et une faible affinité au calcium. La présence de canaux de type T dans le tubule contourné distal a été confirmée par des études en RT-PCR sur des segments de néphrons microdisséqués. Ils sont aussi exprimés dans les tubules connecteurs et les tubes collecteurs (*Andreasen et al.* 2000). A l'aide d'un anticorps dirigé contre les 22 premiers acides aminés de la sous-unité  $\alpha$  de ce type de canal, les mêmes auteurs ont pu détecter les canaux de type T au pôle apical des cellules du tubule contourné distal et dans la partie médullaire des tubes collecteurs. Ces données démontrent que ce type de canal pourrait être impliqué dans la réabsorption calcique rénale.

Par contre, la méthode classique consistant à purifier le transporteur calcique membranaire et à le séquencer après isolation a vite montré ses limites à cause de la faible densité de matériel présent, même dans les tubules rénaux. D'autres auteurs ont essayé des stratégies de clonage basées sur l'utilisation de séquences des canaux calciques voltage-dépendants déjà caractérisés (*Barry et al.* 1998b). De nombreuses sous-unités tant primaires que secondaires ont ainsi pu être détectées dans les épithéliums tubulaires. Le groupe de Bindels a ensuite tenté d'exprimer dans des ovocytes de *Xénope* une librairie d'ADNc issue de cellules de tubules connecteurs et collecteurs de lapin en culture primaire (*Hoenderop et al.* 1999b). Cette technique tirait partie du fait qu'il n'y a pas d'influx calcique endogène particulier dans l'ovocyte de *Xénope*. Après expression de la banque d'ADNc, le transport de calcium était multiplié par 3 et ce, même en présence d'un cocktail d'inhibiteurs spécifiques des canaux calciques voltage-dépendants (nifédipine, vérapamil,  $Ba^{2+}$ ) mais sans mibéfradil. Certains ovocytes montraient alors encore un influx de calcium. Ils ont permis d'isoler un transcrite codant pour le canal calcique ECAC1 ou TRPV5. Comme nous l'avons vu plus haut, ses caractéristiques électrophysiologiques, structurales et la localisation de ces canaux font d'eux des acteurs importants de l'entrée du calcium

dans les cellules rénales mais rien n'indique qu'ils soient les seuls ou les plus importants.

Le passage du calcium à travers la membrane apicale pourrait être un des facteurs limitant dans le phénomène de la réabsorption. Ceci impliquerait que la disponibilité du calcium cytosolique pour les pompes calciques basolatérales contrôlerait le débit de l'efflux calcium. Les ions  $H^+$  en particulier sont capables d'inhiber les canaux calciques voltage-dépendants dans les tissus excitables en changeant leur conformation et en modifiant leur cinétiques d'ouverture.

#### 1.3.4.2 La diffusion cytosolique.

Les cellules épithéliales doivent faire face à un double défi : assurer le transport des ions  $Ca^{2+}$  du pôle apical vers le pôle basolatéral tout en maintenant une concentration calcique intracellulaire assez basse pour être compatible avec le bon fonctionnement des cellules. Deux modèles ont été présentés dans la littérature pour expliquer ce phénomène :

1) Le modèle de la diffusion facilitée qui repose sur la présence de protéines 'navettes' pour le calcium, sous la dépendance de la vitamine D. Comme nous l'avons vu, la vitamine D est hydroxylée une première fois dans le foie par la 25-hydroxylase et une seconde fois dans le rein par le 25-hydroxyvitamine  $D_3$   $1\alpha$  hydroxylase pour donner naissance à la 1,25-dihydroxyvitamine  $D_3$  ( $1,25(OH)_2D_3$ ) qui est le métabolite le plus actif de la vitamine D.  $1,25(OH)_2D_3$  agit ensuite selon le mode d'action génomique commun à tous les stéroïdes en se fixant au récepteur de la vitamine D (VDR) cytoplasmique. Après migration dans le noyau, le couple  $1,25(OH)_2D_3$  – VDR déclenche la transcription et la traduction des protéines fixant le calcium. Chacune de ces calbindines est codée par un gène indépendant, sans association évidente entre eux. Elles font toutes partie de la classe des protéines 'EF-hands' (calbindine  $D_{28K}$ , calbindine  $D_{9K}$ , calmoduline, parvalbumine, troponine C, S100). La calmoduline et la troponine ont en outre la capacité de se fixer sur un motif particulier présent à l'extrémité C-terminale de la sous-unité  $\alpha$  des canaux calciques

voltage-dépendants. De cette façon, elles peuvent en modifier le fonctionnement et notamment permettre leur ouverture de manière calcium dépendante (*Soldatov* 2003). Il faut noter que ce domaine n'est pas présent dans la structure de TRPV5 et TRPV6. Concernant plus particulièrement D<sub>28K</sub> et D<sub>9K</sub>, elles facilitent donc la diffusion du calcium entre le pôle apical et le pôle basolatéral de la cellule épithéliale. Par exemple, notre laboratoire a mis en évidence qu'une déficience en vitamine D entraînait *in vivo* une diminution du transport de calcium à la fois au niveau des membranes basolatérales et des membranes luminales des cellules du tubule contourné distal (*Bouhtiauy et al.* 1993). Puis des expériences ont été menées avec les calbindines D<sub>28K</sub> et D<sub>9K</sub>. Nous avons montré que ces deux molécules étaient bien responsables des changements observés dans les expériences menées avec la vitamine D (*Bouhtiauy et al.* 1994a) (*Bouhtiauy et al.* 1994b). Elles agissent cependant de façon différente : alors que la calbindine D<sub>28K</sub> stimule l'entrée de Ca<sup>2+</sup> par la membrane luminale, la 9K active la pompe calcique de la membrane basolatérale aussi bien dans le tubule proximal que distal.

La calbindine D<sub>28K</sub> est très conservée, possède 4 sites de forte affinité au calcium, et est présente dans les reins, le pancréas, les os et le cerveau. La D<sub>9K</sub> quant à elle possède 2 sites de fixation au calcium, et est présente dans le tubule contourné distal seulement chez la souris. Le niveau d'expression de ces calbindines est étroitement corrélé avec l'efficacité de réabsorption calcique observée. Il n'y a pas d'homologie de séquence entre D<sub>28K</sub> et D<sub>9K</sub>, les deux molécules étant présentes de façon prédominantes dans le cytosol (*Christakos et al.* 1989). Pourtant, elles ont été localisées en étroite association avec les membranes microsomiales des cellules tubulaires distales et avec les bordures en brosse de membranes purifiées d'entérocytes de poulet (*Shimura and Wasserman* 1984). On peut donc se poser la question de savoir si D<sub>28K</sub> et D<sub>9K</sub> ont un rôle limité au transport de calcium à travers le cytoplasme ou si au contraire, de part la localisation membranaire d'une partie de ces protéines, elles pourraient tenir un rôle plus complexe concernant l'entrée de calcium dans la cellule épithéliale comme le deuxième modèle ci-dessous le suggère.

2) Le modèle vésiculaire est celui dans lequel la cellule épithéliale utilise ses lysosomes pour séquestrer le calcium et faciliter ses mouvements vers la membrane basolatérale de la cellule. La formation de ces vésicules est initiée par l'augmentation soudaine de la concentration calcique dans le microenvironnement sous-membranaire. Le calcium provoque le désassemblage des filaments d'actine voisins des canaux calciques apicaux ce qui permet la formation des vésicules. Le calcium se fixe à la calmoduline associée aux canaux calciques induisant leur inactivation. La concentration en ions  $\text{Ca}^{2+}$  diminue, permettant la reformation du réseau d'actine. Les vésicules sont ensuite transportées le long du réseau microtubulaire vers les lysosomes et vers le pôle basolatéral de la cellule (*Larsson and Nemere 2002*). Cependant, les données expérimentales concernant les calbindines  $\text{D}_{28\text{K}}$  et  $\text{D}_{9\text{K}}$  auraient plutôt tendance à confirmer le modèle de diffusion facilitée.

#### 1.3.4.3 L'extrusion du calcium.

L'extrusion du calcium au pôle basolatéral de la cellule vers le système circulatoire se fait contre un fort gradient électrochimique. Deux transporteurs ont été caractérisés : l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) et une ATPase  $\text{Ca}^{2+}$  dépendante (PMCA).

##### *A L'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX)*

Trois gènes ont été identifiés chez les mammifères: NCX1, 2 et 3. Les protéines partagent 70% d'homologie, plus précisément la séquence d'acides aminés N terminaux, deux ensembles de domaines transmembranaires multiples en hélice  $\alpha$ , et une large boucle intracellulaire (*Blaustein and Lederer 1999*). Les ARN codant pour NCX subissent l'épissage alternatif, ajoutant encore à la diversité des protéines finales. En 1992, la séquence de NCX1 issu du rein de lapin a été publiée (*Reilly and Shugrue 1992*) et l'expression de ce transporteur dans le rein a pu être restreinte aux membranes basolatérales des cellules du DCT (*Ramachandran and Brunette 1989*). NCX1 est présent dans un grand nombre de tissus alors que NCX2 et 3 sont surtout

localisés dans le cerveau et les muscles squelettiques (*Li et al.* 1994). Malheureusement, aucun inhibiteur spécifique de NCX n'est actuellement disponible, il est donc difficile de quantifier son importance relative par rapport au transport calcique global à travers la membrane basolatérale. Néanmoins, des éléments laissent à penser que NCX1 représente le mécanisme d'extrusion primaire, la pompe calcique PMCA ne jouant qu'un rôle secondaire, tout du moins dans le DCT (*van Baal et al.* 1996). La stœchiométrie de cet échangeur a également été étudiée et les résultats varient entre  $4\text{Na}^+/1\text{Ca}^{2+}$  et  $3\text{Na}^+/1\text{Ca}^{2+}$  (*Baker et al.* 1969) (*Mullins* 1979). NCX est donc électrogénique.

NCX est régulé par plusieurs facteurs dont le potentiel de membrane, la PKC, les protons les nucléotides et la PTH (*Blaustein and Lederer* 1999). La PTH augmente significativement l'activité de NCX1 via un mécanisme AMPc dépendant. De même, la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  influe sur l'expression de NCX1. Chez les souris knock-out pour la vitamine D, la synthèse de NCX1 est fortement diminuée mais peut être restaurée grâce à une supplémentation en  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  (*Hoenderop et al.* 2002a).

En absence d'inhibiteurs spécifiques, certaines équipes ont donc cherché à développer des modèles animaux knock-out pour NCX1. Malheureusement, le cœur de ces animaux ne peut battre spontanément, ils meurent donc *in utero*.

#### *B ATPase $\text{Ca}^{2+}$ dépendante (PMCA).*

Les PMCA sont des pompes très spécifiques pour le calcium et sont présentes dans quasiment toute les cellules eucaryotes. Elles participent au maintien de la concentration calcique intracellulaire à des valeurs très faibles. 4 gènes codent pour des isoformes différents notés PMCA 1 à 4. Dans le rein, contrairement à NCX, PMCA est présent dans tous les segments du néphron avec une expression prépondérante dans les membranes basolatérales des cellules du tubule distal.

La présence de  $\text{Mg}^{2+}$  augmente son efficacité (*Brunette et al.* 1987) et sa régulation de PMCA est encore sujette à discussion mais un certain nombre de données suggèrent que cette pompe est sous la dépendance de la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  dans l'intestin et fait partie des cibles privilégiées du calcitriol pour augmenter la

réabsorption calcique. Des analyses en Northern Blot ont d'ailleurs montré que des poulets déficients en vitamine D voyaient leurs niveaux de PMCA augmenter fortement dans le duodénum, le jéjunum, l'iléon et le colon lorsqu'ils étaient soumis à une supplémentation en calcitriol (*Cai et al.* 1993). De façon surprenante cependant, il a aussi été montré que la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  causait une diminution de la quantité de PMCA présente dans la membrane apicale en même temps qu'elle en augmentait la concentration dans la membrane basolatérale.

Des stéroïdes comme les oestrogènes ou la dihydrotestostérone sont aussi capables de réguler de façon positive PMCA dans des proportions comparables à celles de la vitamine D mais sans modifier l'expression des gènes codant pour PMCA. Leurs actions permettraient plutôt de stimuler l'activité des pompes, ce qui sous entendrait la encore un effet non génomique de ces hormones (*Dick et al.* 2003).

En outre, l'équipe de Strehler en 2002 a cherché à quantifier l'importance de PMCA dans l'extrusion du calcium par rapport à NCX (*Kip and Strehler* 2003). Ils montrèrent que 30% du flux calcique était le fait de l'activité de PMCA. Ces résultats sont en accord avec le rôle dominant de NCX démontré en 1992 par l'étude des flux calciques transcellulaires réalisée sur des cultures de tubules collecteurs (*Bindels et al.* 1992).

Le néphron, unité fonctionnelle du rein, est constitué d'épithéliums de réabsorption montrant des propriétés différentes concernant le transport de calcium selon le segment considéré :

#### *1.3.5 Le tubule proximal.*

Ce segment inclut le tubule contourné proximal (PCT) et le tubule droit proximal (PST). Des études de microponction ont démontré qu'il est responsable de 60 à 70% de la réabsorption calcique totale (*Edwards et al.* 1973). Le transport de calcium résulte principalement d'un processus iso-osmotique qui permet la



réabsorption en parallèle du calcium, du sodium et de l'eau. Il s'agit donc d'un phénomène passif qui suit l'absorption locale de sodium.

### 1.3.6 L'anse de Henlé.

Dans les segments minces ascendants et descendants de l'anse de Henlé, la perméabilité pour le calcium est très faible, ce qui a permis de conclure que la réabsorption dans l'anse ne se faisait pas dans ces segments (*Quamme and Dirks* 1980). A l'inverse, la perméabilité pour des ions tels que  $\text{Na}^+$  ou  $\text{Cl}^-$  est importante (*Rocha et al.* 1977).

En revanche, les segments larges et particulièrement le segment ascendant TALH (entre la courbure de l'anse et le début du tubule contourné distal) montrent une bonne perméabilité au calcium (*Bailly et al.* 1990). Approximativement 20% du calcium issu de la filtration glomérulaire est réabsorbé dans ce segment. Bourdeau et Burg (*Bourdeau and Burg* 1979) ont apporté des éléments qui laissent penser que le transport calcique est dû à la présence d'un gradient électrochimique indiquant un processus de réabsorption passive. Des résultats comparables ont été obtenus par Shareghi et Agus (*Shareghi and Agus* 1982) qui ont mis l'accent sur la forte charge positive se trouvant au niveau de la membrane, du côté luminal. Des protéines spécifiques des jonctions serrées du TALH pourraient aussi être impliquées. Par exemple, la nouvelle protéine paracelline-1 semble être importante puisque des mutations de cette protéine sont présentes chez des patients présentant un syndrome associant hypomagnésémie et hypercalciurie (*Blanchard et al.* 2001). Cette étude a donc démontré qu'une mutation homozygote de la paracelline-1 induisait un blocage sélectif de la réabsorption para-cellulaire passive des cations divalents. La réabsorption de NaCl étant, quant à elle, totalement fonctionnelle.

Néanmoins, d'autres équipes ont mis en évidence des phénomènes différents. Par exemple, dès 1978 chez le lapin, le transport de calcium a été qualifié d'actif dans la partie corticale du TALH mais passif dans sa région médullaire. Ces résultats ont ensuite été confirmés chez la souris (*Friedman* 1988). Ainsi des études

immunohistochimiques ont permis de détecter dans le TALH des protéines indispensables au transport trans-cellulaire : TRPV5 et 6, les calbindines, NCX1 ou encore PMCA1b (Hoenderop et al. 2000).

Le TALH représente donc une zone d'importance dans la réabsorption calcique rénale. Elle est surtout due à une composante passive mais de fortes présomptions existent pour qu'un transport actif soit aussi présent dans ce segment.

### *1.3.7 Le tubule contourné distal.*

Alors que 70% du calcium est réabsorbé par le tubule contourné proximal, la régulation précise du flux global d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  entrant se fait dans le tubule contourné distal. Il assure 15% de la réabsorption totale. Le DCT est divisé en plusieurs segments : DCT1 (faisant directement suite à l'anse de Henlé), DCT2 et CNT (connecting tubule) qui débouche directement sur le tubule collecteur. La contribution relative à la réabsorption entre DCT1 et DCT2 d'une part et CNT d'autre part varie en fonction de l'espèce étudiée.

Dans ces tubules, le transport de calcium se fait contre le gradient électrochimique. En outre, les jonctions intercellulaires y sont relativement imperméables. Ces éléments permettent de conclure à l'existence d'un transport actif transcellulaire dans ce segment. Ces dernières années, un certain nombre d'études ont montré que les protéines nécessaires au passage du calcium dans la cellule étaient particulièrement concentrées dans les régions DCT2 et CNT. C'est notamment le cas pour NCX, PMCA, les calbindines  $\text{D}_{28\text{k}}$  et  $\text{D}_{9\text{k}}$  mais aussi pour ECAC1 et 2. La concentration de ces protéines diminue à mesure que l'on se rapproche du CNT. PMCA et NCX disparaissent de façon abrupte dès lors que les études concernent le tubule collecteur. Ces données permettent donc de situer la majorité de la réabsorption calcique dans le tubule contourné distal au niveau de DCT2.

### *1.3.8 Le tubule collecteur.*

Le tubule collecteur (CCD, collecting duct) est le dernier segment du néphron. Il débute juste après le CNT dans le cortex, traverse la médulla externe et interne jusqu'à la partie supérieure de la papille rénale. Il peut donc être divisé en deux segments : le tubule collecteur de la médullaire externe (OMCD, outer medulla collecting duct) et le tubule collecteur de la médullaire interne (IMCD, inner medulla collecting duct). Il est constitué de cellules principales responsables de la réabsorption de NaCl et de l'eau ainsi que de la sécrétion de  $H^+$  et  $HCO_3^-$ . Lorsque l'on compare la quantité de calcium présente dans le dernier segment du DCT accessible par microponction et la calciurie dans l'urine finale, on peut déterminer que le CCD est responsable d'environ 3% de la réabsorption calcique totale.

Nous venons donc d'exposer les différents facteurs qui influencent le métabolisme calcique dans l'organisme. En plus des hormones dont les rôles principaux sont de régir les flux de calcium, il existe un certain nombre de molécules informatives dont la cible primaire ne se situe pas au niveau organes impliqués dans la balance calcique mais à d'autres niveau. Par exemple, Les œstrogènes diminuent le transport de calcium dans le tubule distal alors qu'ils augmentent la réabsorption du sodium dans le proximal et le distal (*Brunette and Leclerc 2001*). De même, la progestérone potentialise les flux calciques vers le milieu interne dans le tubule distal du néphron (*Brunette and Leclerc 2002*). Ces deux stéroïdes font partie des hormones sexuelles auxquelles notre laboratoire s'est intéressé sous l'angle du transport ionique par le néphron de lapin. Or, aucune donnée concernant la testostérone et son rôle éventuel dans la réabsorption de calcium par le rein n'est disponible. Pourtant, des études comme celle de Guo (*Guo et al. 2002*) ont prouvé la capacité de ce stéroïde à déclencher un afflux de calcium extracellulaire dans la cellule. Dans ces conditions, pourquoi ne pas envisager que les androgènes puissent, tout comme les stéroïdes sexuels féminins, participer à la régulation de l'excrétion de calcium ?

Dans cette optique, nous allons exposer le fonctionnement de cette hormone, depuis sa phase de synthèse dans les cellules de Leydig du testicule jusqu'à ses différents modes d'action recensés à ce jour.

## 2 La testostérone.

### 2.1 Stéroïdogénèse dans les cellules de Leydig

Les androgènes sont les principaux stéroïdes sécrétés par les testicules, la testostérone étant le plus important. Bien qu'il ait déjà été proposé que les tubules séminifères présentassent une activité stéroïdogénique (*Strewler et al.* 1987), des études ont montré que les deux enzymes principales de la synthèse androgénique, le cytochrome P450<sub>scc</sub> (side chain cholesterol cleavage) et la 3 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase/5-ène-4-ène isomérase (3 $\beta$ -HSD), n'étaient pas exprimés dans les tubules séminifères (*Rouiller et al.* 1990). Ces tissus ne sont donc pas capables de convertir le cholestérol en pregnenolone. Les cellules de Leydig sont le siège principal de la synthèse androgénique dans le testicule.

Le cholestérol est le plus important mais probablement pas le seul substrat pour la synthèse de stéroïdes dans ces cellules. Les réserves de cholestérol y sont matérialisées par des gouttelettes lipidiques cytoplasmiques qui disparaissent durant les périodes de synthèse intense. Ce substrat peut aussi bien être synthétisé *de novo* à partir d'acétate ou encore apporté à la cellule par l'intermédiaire des lipoprotéines plasmatiques. Les cellules de Leydig de porc par exemple utilisent les LDL préférentiellement, alors que les cellules de rats métabolisent plutôt les HDL (*Chen et al.* 1980). La transformation du cholestérol en testostérone nécessite 3 hydroxylations (C<sub>17</sub>, C<sub>20</sub>, C<sub>22</sub>), deux clivages (C<sub>20</sub>-C<sub>22</sub>, C<sub>17</sub>-C<sub>20</sub>), deux déshydrogénations (3 $\beta$  et 17 $\beta$ ) et une isomérisation  $\Delta^{4-5}$ .

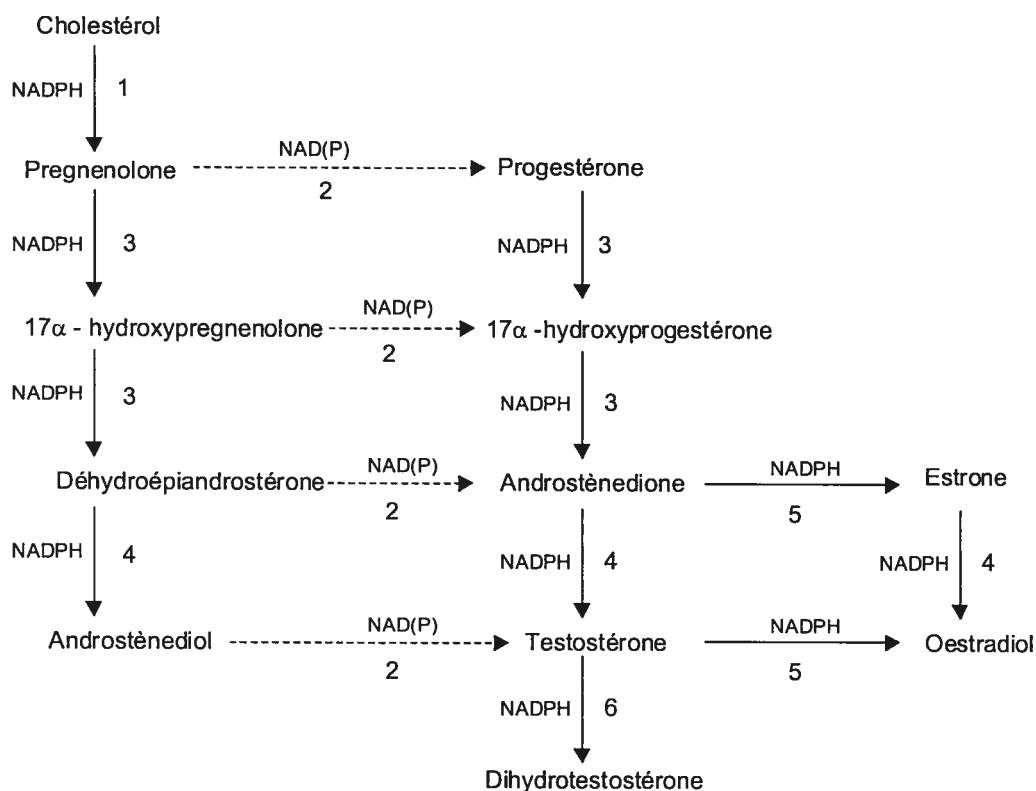


Figure 5 : Représentation schématique de la voie de biosynthèse de la testostérone dans le testicule. 1, Side Chain Cholesterol Cleavage (P450<sub>scc</sub>); 2, 3 $\beta$ - hydroxystéroïde dehydrogenase  $\Delta^5/\Delta^4$  isomerase (3 $\beta$ -HSD); 3, P450 17 $\alpha$  hydroxylase (P-450 17 $\alpha$ ); 4, 17 $\beta$  hydroxystéroïde déshydrogénase (17 $\beta$  HSD); 5, P450 aromatase (P450<sub>aro</sub>); 6, 5 $\alpha$  réductase.

### 2.1.1. Conversion du cholestérol en pregnenolone.(réaction 1)

Cette première étape est cruciale car elle représente le facteur limitant de la synthèse globale d'androgènes dans la cellule de Leydig. Le clivage de la chaîne latérale du cholestérol se fait dans la membrane interne mitochondriale et nécessite la présence de trois enzymes : le cytochrome P450<sub>scc</sub>, l'adrénodoxine et l'adrénodoxine réductase. Ces trois protéines ont été clonées et purifiées.

La pregnénolone formée est rapidement relarguée à cause de son groupement hydroxyl qui produit de puissantes forces de répulsion par rapport au pôle hydrophobe de l'enzyme cytochrome P450<sub>scc</sub>. Le mécanisme par lequel la pregnénolone sort de la mitochondrie n'est pas encore connu mais doit être

relativement rapide puisque la concentration mitochondriale de ce stéroïde est faible.

La plupart des hormones stéroïdogéniques et la LH (luteinizing hormone) en particulier pour le testicule, agissent en augmentant le transfert de cholestérol vers la mitochondrie. Elles induisent donc une augmentation de la disponibilité du cholestérol cytoplasmique et potentialisent le transfert vers la mitochondrie.

Depuis les années 80, beaucoup d'études ont porté sur la caractérisation des protéines impliquées dans ce transport. SCP2 (sterol carrier protein 2) par exemple, est une protéine de 13 kDa purifiée à partir de tissus hépatiques. Elle stimule l'activité d'un certain nombre d'enzymes microsomiales prenant part à la synthèse et à l'utilisation du cholestérol (*Vahouny et al.* 1984). Elle est aussi capable d'augmenter le transfert du cholestérol à partir des gouttelettes lipidiques cytoplasmiques jusque dans la mitochondrie. Un second facteur important dans ce transport est le SAP (steroidogenesis activator polypeptide). SAP a la capacité de stimuler le transport intra-mitochondrial. Enfin le DBI (diazépam binding inhibitor) ou endozépine, joue un rôle central dans le passage du cholestérol vers la membrane interne de la mitochondrie. Le DBI est présent dans beaucoup de tissus mais les plus fortes concentrations se retrouvent dans le cortex surrénalien, les cellules de Sertoli, les cellules de Leydig et dans le fluide intestinal. Il est capable de se fixer aux récepteurs mitochondriaux des benzodiazépines qui sont nombreux dans les cellules de Leydig et les cellules gliales. Les agonistes des benzodiazépines stimulent la stéroïdogénèse dans les cellules surrénaliennes, les cellules de Leydig et les cellules de la granulosa (*Garnier et al.* 1993).

#### 2.1.2. Conversion des stéroïdes $3\beta$ - hydroxy-5-ène en stéroïdes 3-kéto-4-ène (réaction 2).

Cette réaction est catalysée par la  $3\beta$ -HSD (3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase  $\Delta^5/\Delta^4$  isomerase) qui représente en fait une large famille d'enzymes. Chez l'humain, deux gènes (type I et type II) et trois pseudogènes ont

été clonés. L'ARNm de type I est presque exclusivement présent dans le placenta et la peau, alors que le type II est localisé dans les surrénales, les testicules et les ovaires. Les deux types peuvent catalyser la déshydrogénation des 3 $\beta$ -hydroxystéroïdes mais aussi l'isomérisation des C-21 et C-19.

#### *2.1.3. Conversion des stéroïdes C-21 en stéroïdes C-19 (réaction 3).*

Cette réaction s'effectue en deux étapes : (1) hydroxylation en position  $\alpha$  de C-17 suivi du (2) clivage de la liaison covalente entre C-17 et C-20. Ces deux événements sont catalysés par une seule et même enzyme, le cytochrome P450 17 $\alpha$  hydroxylase (P-450 17 $\alpha$ ). La présence de deux activités enzymatiques au sein d'une seule structure protéique a été démontrée grâce à la purification de P-450 17 $\alpha$  à partir de testicules et de glandes surrénales de porc. Sa structure est identique chez l'humain, puisque l'ADNc a pu être isolé, toujours à partir de testicules et de glandes surrénales (Nakajin *et al.* 1984).

#### *2.1.4. Conversion des 17 $\beta$ hydroxystéroïdes en 17 kétostéroïdes (réaction 4).*

Les transformations de l'androstènedione en testostérone, du déhydroépiandrostérone en androstènediol et de l'estrone en oestradiol dépendent toutes de la présence de l'enzyme microsomiale 17 $\beta$  hydroxystéroïde déshydrogénase (17 $\beta$  HSD). Cette enzyme, un polypeptide de 327 acides aminés, a tout d'abord été purifiée chez l'humain à partir d'un homogénat de placenta (Bradshaw *et al.* 1987). L'ADNc placentaire de la 17 $\beta$  HSD a donc pu être isolé et a permis la localisation du gène sur le chromosome 17. Aussi bien chez l'humain que chez le rat, les ARNm codant pour 17 $\beta$  HSD sont présents dans tous les tissus étudiés. Cependant, les capacités androgéniques (conversion de l'androstènedione en testostérone) et oestrogéniques (estrone transformé en



oestradiol) varient selon un contrôle génétique de l'activité de l'enzyme (*Martel et al.* 1992).

#### 2.1.5. Conversion des androgènes en œstrogènes (réaction 5).

La synthèse d'oestradiol à partir de la testostérone nécessite l'aromatisation du cycle carboné A. Cette réaction est catalysée par la P450 aromatasase (P450<sub>aro</sub>) localisée dans les microsomes. La réaction nécessite 3 moles d'oxygène ainsi que 3 électrons issus de la réduction de NADPH par P450 réductase. P450<sub>aro</sub> a été purifiée à partir de placentas humains par plusieurs groupes (*Fishman and Goto* 1981) (*Nakajin et al.* 1986). De même, l'isolation de son ADNc a permis de montrer que la région codante donnait naissance à une protéine de 419 acides aminés et que le gène de la P450<sub>aro</sub> utilisait une régulation transcriptionnelle tissus dépendante.

Les testicules d'un grand nombre d'espèces sont capables de produire des œstrogènes, mais dans la plupart des cas, la synthèse est faible excepté chez le verrat et le cheval où la sécrétion d'œstrogènes (principalement sous forme de sulfate) peut même être plus importante que celle de testostérone (*Raeside et al.* 1988). Les œstrogènes sont formés dans les cellules de Sertoli stimulées par la FSH chez le rat immature (*Dintinger et al.* 1989) mais à mesure que le rat vieillit, le site oestrogénique principal semble se déplacer vers les cellules de Leydig fonctionnant sous l'influence de la LH.

#### 2.1.6. Conversion de la testostérone en dihydrotestostérone (DHT) (réaction 6).

Cette réaction est sous la dépendance de la 5 $\alpha$  réductase, une enzyme microsomiale elle aussi, et dont le fonctionnement nécessite la présence de NADPH. La DHT est le métabolite le plus actif de la testostérone, responsable notamment de la différenciation de l'appareil génital masculin et de la prostate,

ainsi que des processus de virilisation à la puberté (*Canick et al.* 1979). Bien que la plus grande partie de la transformation de la testostérone se fasse dans les tissus périphériques androgènes sensibles, une activité de la 5 $\alpha$  réductase est détectable dans le testicule. En effet, la concentration en DHT mesurée dans le plasma issu de la veine spermatique est plus grande que celle relevée dans le plasma périphérique. Dans le testicule de rat immature, l'activité 5 $\alpha$  réductase est élevée ce qui implique qu'à ce stade, la majorité des androgènes produits le sont sous forme de DHT. Cette particularité serait due à l'action de la LH et de la prolactine qui maintiendraient une activité 5 $\alpha$  réductase élevée chez les rats prépubères. Elle décroît ensuite à la puberté sous l'influence de la FSH pour laisser la testostérone comme représentant majoritaire des androgènes synthétisés par le testicule.

## **2.2 Tissus cibles : actions génomiques de la testostérone.**

### *2.2.1 Structure du récepteur aux androgènes.*

La testostérone et la DHT agissent dans un grand nombre de tissus via le récepteur aux androgènes (AR). C'est un facteur de transcription ligand dépendant. Il fait partie de la famille des récepteurs aux stéroïdes. Ces protéines interagissent avec une séquence d'ADN spécifique lorsqu'elles sont liées à leur ligand. AR est une protéine de 110 Kd qui comporte 918 acides aminés (*Chang et al.* 1988), codée par un gène contenant 8 exons, situé sur le bras long du chromosome X. Elle comporte plusieurs domaines : 1) domaine de transactivation NH<sub>2</sub> terminal, 2) domaine de liaison à l'ADN, 3) domaine de translocation et 4) domaine de fixation à la testostérone.

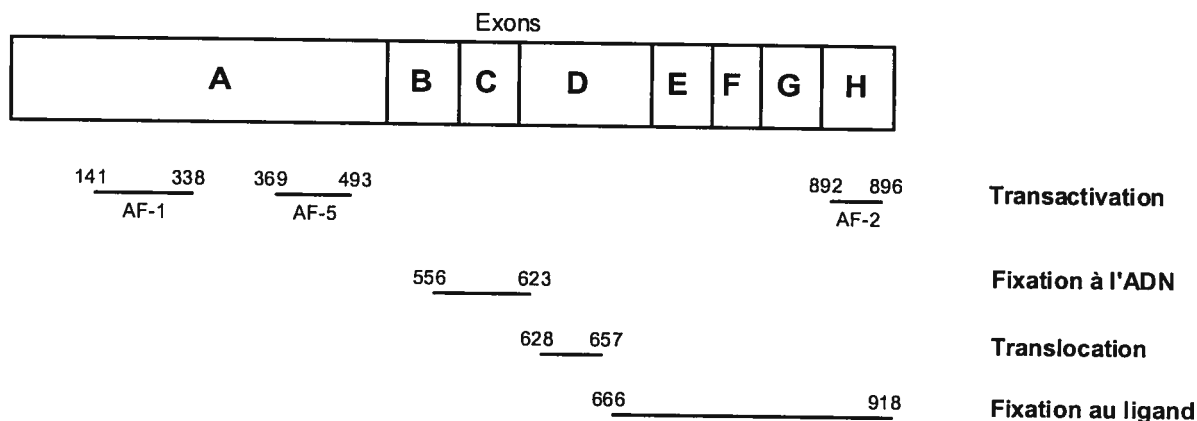


Figure 6 :Domaines fonctionnels du récepteur aux androgènes humain.

Le domaine de transactivation est constitué de trois régions principales : AF-1, AF-2 et AF-5 (*Berrevoets et al. 1998*). Ce sont ces séquences d'acides aminés qui sont responsables de la capacité du récepteur à déclencher une activité transcriptionnelle lorsqu'il est fixé sur l'ADN.

Le domaine de fixation à l'ADN est caractérisé par la présence de 2 structures en doigt de zinc capables de se fixer aux nucléotides d'une séquence consensus ARE (androgen response element). Elle représente 67 acides aminés et est très conservée dans l'évolution des espèces.

Le domaine de translocation confère à l'AR la possibilité de migrer dans le noyau à partir du cytoplasme. Il est constitué de plusieurs groupements d'acides aminés basiques au voisinage immédiat du deuxième doigt de zinc du domaine précédent (*Baumann et al. 1999*). Il faut noter que ce domaine fait partie, avec les 266 acides aminés suivants, de la séquence permettant la dimérisation du récepteur (*Sack et al. 2001*).

Le domaine de fixation à la testostérone a été étudié par cristallographie. C'est une poche formée de 11 à 13 hélices  $\alpha$  (*Williams and Sigler 1998*). La comparaison des structures en présence ou en absence de testostérone a montré que l'hélice 12 ainsi que le domaine AF-2 subissaient un mouvement conformationnel visant à bloquer le stéroïde dans son réceptacle (*Brzozowski et al. 1997*). En outre, c'est cette hélice 12 qui semble être critique pour la spécificité du récepteur à son ligand, comme l'a montré une étude comparant AR au récepteur des œstrogènes.

### 2.2.2 Distribution de AR.

La première approche utilisée pour détecter AR dans les tissus a été le radiomarquage en utilisant ( $^3\text{H}$ )-testostérone (*Gustafsson and Pousette 1975*). Puis, vint le développement des anticorps anti-AR qui permit d'augmenter sensiblement les seuils de détection. Ainsi, en 1990, l'équipe de Chang (*Takeda et al. 1990*) évalua la distribution d'AR dans les tissus de rat. Ils ont pu démontrer que tous les organes sexuels mâles montraient un fort signal nucléaire pour AR. Les autres tissus, comprenant notamment le foie, les reins, les neurones, les muscles et le système reproducteur femelle étaient aussi positifs, mais plus faiblement. Le seul tissu à être à priori négatif pour AR était la rate. D'autres équipes ont en parallèle essayé d'identifier les ARNm codant pour AR au lieu de la protéine. Le clonage de L'AR humain (*Chang et al. 1988*) et murin (*Lubahn et al. 1988*) a permis de développer les sondes nécessaires à l'identification d'AR par northern blot ou par hybridation *in situ*. La sensibilité fut ensuite grandement améliorée en utilisant la RT-PCR compétitive.

Organe	Mâle	Femelle
hypothalamus	217	42
épididyme	115	ND
Glande thyroïde	68	ND
hypophyse	56	9
quadriceps	35	ND
Reins	27	7
vésicule séminale	25	ND
Foie	18	9
Cœur	8	7
testicules	20	ND
vésicules séminales	25	ND
Vagin	ND	9
ovaires	ND	4
utérus	ND	2

Table 1 : Abondance relative des ARNm codant pour AR en fonction des tissus chez le rat. Données en pourcentages d'ARNm détectés dans la prostate de 5 mâles. ND : non déterminé. D'après (Young W.J et al. 1994).

AR peut donc être facilement qualifié d'ubiquitaire et cette large distribution reflète le nombre très important d'effets biologiques induits par les androgènes.

### 2.2.3 Régulation des récepteurs aux androgènes.

#### 2.2.3.1 Phosphorylations.

AR comporte des sites de phosphorylation notamment au niveau du domaine de translocation. Le premier ajout de phosphore se fait juste après la traduction de AR, de façon androgène indépendante. La deuxième phosphorylation a été détectée après la fixation de la testostérone, probablement sous l'action des kinases akt et Mdm2 (*Brinkmann 2001*). L'addition du phosphore modifie les propriétés de reconnaissance des séquences ARE par le récepteur et peut même entraîner la destruction du récepteur aux androgènes par le protéasome.

#### 2.2.3.2 Coactivateurs.

Ce sont des protéines qui augmentent l'activité transcriptionnelle du couple ligand-récepteur. Ils peuvent servir de protéines adaptatrices, recrutant elles-mêmes d'autres protéines ou interagissant avec la machinerie transcriptionnelle. Un grand nombre de ces coactivateurs ont déjà été identifiés. La plupart ne sont pas exclusifs à AR et sont capables de modifier le fonctionnement d'autres récepteurs stéroïdiens. On peut citer notamment les protéines de la famille ARA (androgen receptor activator). Au moins 6 ont été déjà caractérisés, de 24 à 267 Kda. Cependant, l'importance relative et les fonctions précises de chacune de ces molécules ne sont pas encore connues.

#### 2.2.3.3 Corépresseurs.

Ces molécules ont la propriété de bloquer l'activité transcriptionnelle basale des récepteurs aux androgènes. Parmi elles, il faut noter la présence de p53 qui a la capacité de bloquer les interactions des extrémités amino et carboxy terminales de AR responsables de la dimérisation (*Shenk et al. 2001*). De même, la cycline D1 peut se lier à la partie N terminale de AR et ainsi empêcher la fixation de la testostérone sur son récepteur. D'autres molécules ont montré des capacités inhibitrices pour AR comme HBO1, Re1A, la kinase Pyk2 ou encore le récepteur testiculaire TR4 (testicular orphan receptor 4).

### **2.3 Les stéroïdes: Classification de Mannheim.**

Le modèle d'action classique des stéroïdes que nous venons d'évoquer pour la testostérone implique la fixation de l'hormone sur un récepteur cytosolique. Le couple ainsi formé est ensuite transloqué dans le noyau afin d'y jouer son rôle de facteur de transcription et déclencher une synthèse protéique. Les effets de ce processus complexe ne sont naturellement détectables qu'au bout d'un laps de temps conséquent, considérant la nécessité d'une transcription et d'une traduction. Or, depuis quelques années, il apparaît comme étant de plus en plus évident qu'un grand nombre d'hormones stéroïdiennes montrent des effets détectables au bout de quelques minutes. Ces données importantes ont donc permis de démontrer qu'il existait d'autres modes d'action que le modèle génomique pour les hormones stéroïdes.

Ces nouveaux mécanismes ne sont pas uniformes : ils varient en fonction de l'hormone considérée et du modèle étudié. Lors du 'Premier congrès sur les réponses rapides des hormones stéroïdes' à Mannheim en 1998, il a donc été décidé de mettre au point une classification rigoureuse permettant de mieux comprendre les actions non génomiques des stéroïdes.

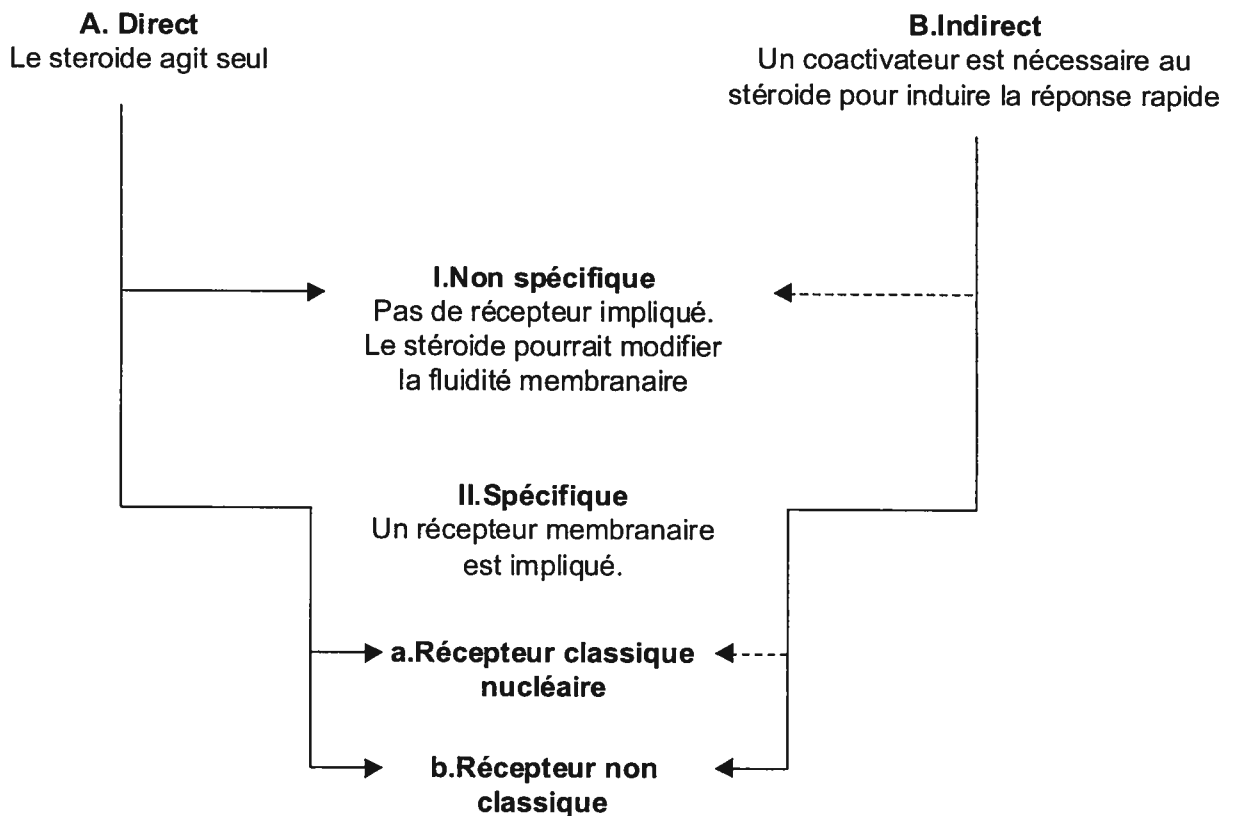


Figure 7 : Classification des actions non génomiques des stéroïdes. Lignes pointillées : pas encore d'exemples connus. Lignes pleines : cas déjà rapportés. D'après (Falkenstein et al. 2000)

### 2.3.1 Action directe sans récepteur impliqué. (A.I)

De part leur nature lipidique, les stéroïdes sont capables de s'insérer dans la bicouche lipidique constituant les membranes biologiques. Ils modifient alors les caractéristiques de fluidité, de résistance et de perméabilité de ces membranes. Ainsi, la progestérone à forte concentration fait diminuer la fluidité des membranes de vésicules préparées à partir d'extraits lipidiques de spermatozoïdes humains. Ce phénomène provoque l'agrégation des vésicules, la fusion membranaire et finalement l'augmentation de la perméabilité membranaire (Shivaji and Jagannadham 1992). Ces données pourraient éclairer le fait que la progestérone est connue pour être un facteur déclenchant de la réaction acrosomiale caractérisée par un afflux de



calcium intracellulaire. Au contraire, les mêmes expériences réalisées avec l'oestradiol ou la testostérone ne démontrent pas de changements notables. Par contre, ces deux dernières hormones sont capables d'activer la  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase de la membrane sarcoplasmique de façon dose dépendante en modifiant la mobilité des lipides au sein de la bicouche lipidique membranaire et donc le fonctionnement des protéines membranaires (*Whiting et al.* 2000). De même la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  est susceptible de modifier l'activité de la phosphatase alcaline via une modification de la fluidité membranaire de chondrocytes (*Swain et al.* 1993). Les stéroïdes montrent donc une certaine spécificité même dans des conditions de concentrations supraphysiologiques.

### *2.3.2 Action directe via les récepteurs classiques génomiques. (A.II.a)*

Le récepteur de la progestérone (PR) a été détecté dans la membrane cellulaire des ovocytes de xénope. Lorsque la progestérone est ajoutée dans le milieu, le récepteur s'associe avec la PI3-kinase qui à son tour active la P42 MAP kinase (*Bagowski et al.* 2001). Lorsque la wortmanine (inhibiteur de la PI3-kinase) est présente, la maturation de l'ovocyte normalement induite par la progestérone est complètement abolie. En outre, chez l'homme, le récepteur à la progestérone possède des motifs riches en proline qui interagissent de façon ligand dépendante avec les domaines  $\text{SH}_3$  (activité tyrosine kinase) présents sur un grand nombre de protéines intracellulaires (*Boonyaratanakornkit et al.* 2001). PR peut donc activer des tyrosines kinases intracellulaires et consécutivement la cascade des MAP kinases. Ces MAP kinases modulent la transcription d'un grand nombre de gènes impliqués notamment dans la prolifération cellulaire. La progestérone serait donc capable de contrôler certains gènes ne possédant pas de séquences promotrices nécessaires à la fixation de son récepteur.

Les récepteurs aux œstrogènes (ER) ont eux aussi été détectés dans les membranes cellulaires. En effet, il existe deux sous-types de ce récepteur : ER  $\alpha$  et

ER  $\beta$  qui sont exprimés de façon différente. Par exemple, ER  $\alpha$  a pu être détecté par immunocytochimie dans la membrane de cellules tumorales hypophysaires de rat (Pappas *et al.* 1995). Lorsque l'oestradiol est ajouté dans le milieu, les auteurs observent une libération de prolactine dans les minutes qui suivent. Le phénomène est inhibé lorsque ER  $\alpha$  est bloqué par des anticorps spécifiques. Les messagers impliqués dans les effets non génomiques des œstrogènes sont nombreux.

### 2.3.3 Action directe via un récepteur non classique (A.II.b)

La majorité des effets rapides des stéroïdes sur la signalisation intracellulaire est dépendante de récepteurs membranaires n'ayant aucun rapport avec les récepteurs intracellulaires décrits précédemment. Les caractéristiques physiologiques de ces sites de fixation membranaires (qui ont été décrits pour toutes les classes de stéroïdes) sont très différentes de celles observées pour les récepteurs classiques. Par exemple, les effets rapides de l'aldostérone sur les transports ioniques et sur l'activation des seconds messagers ont été particulièrement bien décrits. En 2004, notre laboratoire a ainsi mis en évidence une élévation de la réabsorption du calcium dans le tubule contourné distal du néphron de lapin après 5 min d'incubation en présence d'aldostérone ( $10^{-8}$ M) (Leclerc *et al.* 2004). Cette hormone stimule l'ouverture de deux types de canaux calciques : type T (basse affinité) et type L (haute affinité). De plus, le transport membranaire est inhibé par le génistein et par l'AG18, deux inhibiteurs à large spectre des activités tyrosine kinase, suggérant un mode d'action inédit de l'hormone. Dans d'autres modèles, comme les leucocytes mononucléés ou les cellules musculaires lisses vasculaires, l'aldostérone provoque la synthèse d'IP<sub>3</sub> en 30 secondes, avec un IC<sub>50</sub> de l'ordre de 0,1 nM. (Christ *et al.* 1995). Le même type de résultats est obtenu lorsque le calcium intracellulaire est mesuré : sa concentration augmente pour atteindre un plateau en 2 ou 3 min (Wehling *et al.* 1994). La canrénone, inhibiteur du récepteur classique aux minéralocorticoïdes, est inefficace, indiquant la encore la présence probable d'un autre site de fixation pour

l'hormone. A ce sujet, des expériences ont été effectuées sur des membranes cellulaires microsomiales sur lesquelles on a pu détecter des sites de fixation pour l'aldostérone caractérisés par un  $K_d$  de 0,1nM (*Christ et al.* 1994). Ce mode d'action particulier de l'aldostérone a aussi été mis en évidence *in vivo*. En 1992, l'équipe de Wheling (*Wehling et al.* 1998) montra que l'aldostérone pouvait augmenter la résistance vasculaire systémique en seulement 3 min.

La  $1,25(OH)_2D_3$  a la capacité de pouvoir se fixer sur la membrane cellulaire par l'intermédiaire d'un récepteur différent de son récepteur cytoplasmique. Ainsi, une équipe a rapporté l'activation rapide de la PKC par  $1,25(OH)_2D_3$  (*Wali et al.* 1990), tandis qu'une autre mentionnait une augmentation de la phosphorylation des MAP kinases 30 secondes après la stimulation (*Song et al.* 1998). Notons aussi que la forme *cis* est potentiellement beaucoup plus active que la forme *trans* qui, elle, a une plus forte affinité pour le récepteur

#### 2.3.4 Action indirecte via un récepteur non classique (B.II.b)

Un stéroïde peut aussi agir comme cofacteur déclenchant un effet rapide. Ce phénomène a été démontré pour les variations d'excitabilité des neurones suite à une stimulation par le GABA (*Paul and Purdy* 1992). Ces stéroïdes comprennent notamment l'allopregnanolone et la tétrahydrodésoxy cortisone (THDOC). Ce sont des activateurs des courants  $Cl^-$  entrants initiés par le GABA. A l'inverse, le sulfate de DHT, possède une activité inhibitrice sur ces courants (*Majewska et al.* 1990). Dans les neurones pyramidaux, le THDOC provoque une augmentation de plus de 700% du potentiel post-synaptique initié par le GABA. Cet effet n'est pas influencé par le RU486, inhibiteur des récepteurs classiques de la progestérone et des minéralocorticoïdes. Le GABA peut aussi stimuler la libération de noradrénaline dans des synaptosomes issus de l'hippocampe. Lorsque l'allopregnanolone est ajouté,

l'effet du GABA est fortement potentialisé alors que l'allopregnanolone seul ne provoque aucun effet sur la libération de noradrénaline (*Schmid et al.* 1998).

Au niveau clinique, les propriétés de ce stéroïde ou de ses précurseurs (dont la progestérone) sont particulièrement étudiées à cause de leurs effets anticonvulsifs. Des dérivés synthétiques de l'allopregnanolone ont même été développés dans le cadre de traitements expérimentaux de l'épilepsie (*Rupprecht and Holsboer* 1999).

## **2.4 Effets non génomiques de la testostérone.**

Les effets rapides des androgènes sur la concentration calcique intra cellulaire ont été étudiés dans plusieurs systèmes. Dans les ostéoblastes de rats mâles, la testostérone (10 pM à 10 nM) provoque une augmentation de la quantité de calcium dans le cytoplasme en seulement 5 secondes. Ces ions  $\text{Ca}^{2+}$  proviennent à la fois du calcium extracellulaire et des stocks du réticulum endoplasmique. En outre, ce phénomène s'accompagne de l'augmentation de la formation d' $\text{IP}_3$  et de DAG (*Lieberherr and Grosse* 1994). A l'inverse, lorsque la même expérience est réalisée sur des ostéoblastes prélevés chez des rats femelles, la testostérone (aux même concentrations) est inefficace (*Lieberherr et al.* 1993). Ceci tendrait à démontrer que le récepteur de la testostérone (AR) serait aussi impliqué dans les réponses non génomiques de la testostérone.

Par ailleurs, d'autres expériences réalisées en présence d'hydroxyflutamide ou d'acétate de cyprotérone indiquent que AR n'est pas forcément nécessaire à ces réponses. Par exemple, une concentration de 50 à 100 nM de testostérone est capable d'induire une augmentation transitoire de la concentration calcique intracellulaire dans des myotubes de rats. Simultanément, la quantité d' $\text{IP}_3$  augmente trois fois (*Estrada et al.* 2000). Des effets rapides des androgènes indépendants de AR ont aussi été observés dans les lymphocytes T. L'équipe de Wunderlich a notamment démontré que l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire était dans ce système, le fruit du seul apport extracellulaire (*Benten et al.* 1999a).

Toutes ces études tendent à confirmer la présence d'un récepteur membranaire responsable des effets rapides des androgènes.

La place de la testostérone au sein de la classification de Mannheim est donc encore fortement discutée aussi bien au niveau des types de récepteurs et de leurs localisations que sur le plan des seconds messagers nécessaires à ses effets rapides non génomiques.

### **3 Conséquences physiologiques des carences en androgènes.**

L'amélioration de l'espérance de vie est particulièrement nette dans les pays développés. La conséquence en est un vieillissement de la population. L'étude de la physiologie du vieillissement, et en particulier l'évolution de la fonction de reproduction, revêt donc un intérêt considérable. La fertilité, la sexualité, et les autres fonctions contrôlées par les stéroïdes sexuels présentent des caractéristiques singulières au cours de l'avancée en âge. Chez la femme, une insuffisance ovarienne avec épuisement du stock folliculaire et carence des sécrétions hormonales sexuelles survient autour de la cinquantaine. Chez l'homme, l'existence d'un phénomène similaire de carence testiculaire appelé 'andropause' est encore l'objet de controverses. En effet il n'y a pas d'interruption brutale et inéluctable de la fonction de reproduction comme c'est le cas chez la femme à la ménopause. Des exemples montrant la conservation de la fertilité chez des hommes d'âge très avancé ont été rapportés. On observe toutefois chez certains hommes agés la survenue de symptômes ressemblant à ceux observés dans le cas d'hypogonadisme : diminution de la pilosité faciale et pubienne, apparition d'une gynécomastie, diminution de la force musculaire, asthénie physique, psychique, sexuelle et dysfonction érectile. Ces signes ont fait rechercher une altération de l'axe hypothalamo-hypophyso-testiculaire au cours de l'avancée en âge. Il a ainsi été mis en évidence un déficit partiel en androgènes survenant chez certains hommes au cours du vieillissement.

Avant de discuter des conséquences d'une carence en androgènes, il est important de bien définir quels sont les critères biologiques communément admis pour définir l'état d'andropause et/ou d'hypogonadisme chez un patient.

### **3.1 Épidémiologie et physiopathologie de l'andropause.**

#### *3.1.1 Diminution de la testostérone avec l'âge.*

Plusieurs études transversales (*Davidson et al. 1983a*) (*Deslypere and Vermeulen 1984*) (*Simon et al. 1992*) ont démontré une diminution de la testostérone circulante au cours du vieillissement chez l'homme, et cette diminution progressive s'observe aussi bien chez les sujets en bonne santé que chez les sujets présentant diverses pathologies responsables d'une faible testostéronémie initiale (*Gray et al. 1991*) (*Warner et al. 1985*). Cette baisse progressive de la testostérone a été récemment confirmée en étudiant l'évolution d'une cohorte d'individus de manière longitudinale (*Harman et al. 2001*). Ce déclin débute en fait assez tôt dans la vie, dès la quatrième décennie, avec une décroissance constante pendant toute la vie. Ce déclin progressif n'aboutit à un déficit seulement pour une certaine proportion des sujets masculins étudiés, proportion qui augmente avec l'âge. Ainsi, le pourcentage de sujets ayant une testostéronémie inférieure à la normale (valeur normale établie chez les hommes jeunes) est de 7% entre 40 et 60 ans, 22% entre 60 et 80 ans, et atteint 37% chez les hommes âgés de plus de 80 ans dans l'étude de l'équipe de Vermeulen (*Vermeulen et al. 1996*). Il a été noté la disparition des variations nyctémérales de la testostérone chez l'homme âgé. Aucune explication physiopathologique à ce dernier phénomène n'a pu être clairement établie. Il n'en demeure pas moins que la différence entre les hommes âgés et les hommes jeunes est plus nette le matin, lorsque la concentration en testostérone est la plus haute chez l'homme jeune (*Bremner et al. 1983*). Il est donc indiqué que les prélèvements sanguins nécessaires à la mesure de la testostéronémie soient réalisés le matin.

### 3.1.2 Augmentation de la SHBG avec l'âge.

Parallèlement à la diminution de la testostérone totale dans le sang, la 'sex hormone binding globulin' (SHBG), protéine de transport des stéroïdes sexuels augmente avec l'âge (*Davidson et al.* 1983a). De ce fait la fraction de testostérone circulante liée à la SHBG augmente alors que la fraction liée à l'albumine et la fraction libre diminuent. Comme la diffusion de la testostérone depuis la circulation dans les tissus cibles se fait préférentiellement à partir de la forme libre et de la fraction liée à l'albumine, l'augmentation de la SHBG va réduire la biodisponibilité de la testostérone circulante pour les tissus cibles. La concentration de SHBG revêt donc une importance capitale lorsqu'il s'agit de poser un diagnostic biologique du déficit androgénique de l'homme âgé.

### 3.1.3 Altération de la fonction gonadotrope avec l'âge.

L'élévation de la LH avec l'âge chez le sujet âgé en bonne santé (*Davidson et al.* 1983a) et la diminution de la réponse testiculaire à l'injection de gonadotrophines chorioniques montrent l'origine testiculaire du déficit en testostérone. Ces données hormonales se trouvent confirmées par la diminution progressive du nombre de cellules de Leydig avec l'âge (*Neaves et al.* 1987). Si l'altération testiculaire périphérique ne fait pas de doute, une altération gonadotrope semble aussi survenir. Elle est relative puisque la concentration basale des gonadotrophines s'élève, mais l'augmentation de leur sécrétion paraît insuffisante pour assurer une stimulation optimale de ce qui reste du tissu testiculaire.

D'autre part, une sensibilité exagérée de l'axe hypothalamo-hypophysaire au feed-back négatif assuré par les concentrations en stéroïdes sexuels fait suspecter une fragilité de la sécrétion gonadotrope chez les sujets âgés

(Deslypere et al. 1987). Leur hypophyse libère, à la suite de chaque pulse de GnRH, une quantité moindre de LH bioactive que les sujets plus jeunes.

#### *3.1.4 Effets de l'âge sur la fonction testiculaire exocrine.*

L'altération testiculaire touche également la fonction exocrine. La diminution du volume testiculaire (Mahmoud et al. 2003), l'augmentation de la concentration plasmatique de FSH (Davidson et al. 1983a) et la diminution de la concentration circulante d'inhibine chez les sujets âgés (Tenover et al. 1988) indiquent une altération du tube séminifère. Celle-ci est confirmée par les observations morphologiques montrant une diminution du nombre de cellules de Sertoli et de la production de spermatozoïdes (Johnson et al. 1984). Toutefois, cette altération n'est que partielle, sans commune mesure avec l'insuffisance ovarienne de la ménopause et elle permet une conservation de la fertilité chez les hommes d'âge avancé.

### **3.2 Symptomatologie du déficit androgénique partiel**

#### *3.2.1 Tissus musculaires.*

La masse et la force musculaire sont associées de façon évidente avec la densité osseuse. Les muscles produisent une charge plus importante sur les os que la gravité elle-même (Burr 1997). Cette stimulation mécanique provoque une ostéogenèse plus importante à cause de relargage de NO et de prostaglandines dans le microenvironnement des ostéoblastes. Lorsque ces stimulations sont associées aux œstrogènes, la réponse ostéogénique est beaucoup plus efficace que pour chacun des stimuli pris séparément. C'est probablement le résultat de l'effet anti-résorption des œstrogènes combiné à une formation osseuse accrue grâce à l'exercice.



Chez la femme, approximativement 4% de la masse musculaire disparaît après la ménopause (*Aloia et al.* 1991). Chez l'homme la force musculaire est préservée jusqu'à l'âge de 60 ans et diminue jusqu'au niveau d'une femme ménopausée aux environs de 75 ans (*Phillips et al.* 1993). La force diminue tout d'abord au niveau des bras. La perte de force musculaire précède le plus souvent la perte de masse osseuse. Un test de contraction isométrique constitue donc un bon indicateur quant à la perte de densité osseuse ultérieure.

La testostérone endogène est associée à la masse et à la force musculaire aussi bien chez les sujets âgés que plus jeunes (*Ramos et al.* 1998). Un traitement combinant de fortes doses de testostérone (300 à 600 mg d'énanthate de testostérone par semaine) et un entraînement musculaire soutenu permettent d'accroître significativement la masse ainsi que la force musculaire chez des sujets mâles. Ces effets sont visibles après 10 à 12 semaines de traitement (*Bhasin et al.* 1996; *Giorgi et al.* 1999).

Cependant, les études disponibles concernant un traitement par des doses conventionnelles de testostérone appliqué à des sujets âgés démontrent le paradoxe de l'effet des androgènes sur le tissu musculaire. En effet, l'augmentation de la masse et/ou de la force musculaire dans ces conditions est très faible voire inexistante (*Tenover* 1992). Les doses physiologiques ne semblent donc pas être efficaces.

### 3.2.2 Testostérone et comportement.

Une concentration sérique élevée en testostérone est généralement associée à un comportement extraverti et agressif, bien que ces données n'aient été démontrées que dans un petit nombre d'études (*Monti et al.* 1977). D'autres auteurs ont trouvé une corrélation entre une testostéronémie élevée et un comportement de délinquant sexuel violent (*Brooks and Reddon* 1996) ce qui constitue la base des castrations médicales ordonnées dans certaines affaires criminelles. L'injection de fortes doses de cypionate de testostérone (600

mg/semaine) à des hommes en bonne santé a des effets très variables selon les sujets, même s'il faut noter que 20% d'entre eux ont pu présenter des comportement agressifs à un moment ou à un autre du traitement (*Pope, Jr. et al. 2000*).

### 3.2.3 Testostérone et dépression.

Le versant psychologique de l'andropause est décrit dans la littérature par des plaintes au niveau de la sensation de bien-être, avec présence inhabituelle d'anxiété et d'irritabilité, de sautes d'humeur et d'un état dépressif (*Burns-Cox and Gingell 1997*). En outre, une plus grande difficulté à se concentrer et un manque de motivation peuvent être ressentis.

Les similitudes entre ces symptômes psychologiques et ceux causés par l'hypogonadisme chez le jeune homme rendent plausibles un lien de causalité entre la déficience en testostérone qui définit l'andropause et le tableau psychologique associé, dans la dépression. La question d'une association entre la symptomatologie dépressive et la testostérone a été envisagée dans une étude épidémiologique sur 856 hommes âgés de plus de 50 ans (*Barrett-Connor et al. 1999*). Les auteurs ont observé une corrélation négative entre les taux de testostérone biodisponible et les scores à l'échelle de dépression de Beck. Les résultats restent significatifs lorsque l'âge, le changement de poids, et la pratique régulière d'exercices physiques sont considérés. Dans la cohorte étudiée, 25 hommes déprimés présentaient des taux de testostérone disponible plus bas de 17% que la moyenne de l'échantillon.

A l'inverse, (*Davies et al. 1992*) n'ont pas observé de différences entre les taux de testostérone des hommes déprimés et ceux des sujets contrôles sur la base de la mesure de la testostérone libre et totale. D'autres études dont le plan expérimental inclut la présence d'un groupe contrôle ont rapporté cette absence de différence significative des taux de testostérone totale entre les patients et les sujets contrôles (*Amsterdam et al. 1981*). Les études épidémiologiques et

neuroendocriniennes n'offrent donc pas de tableau tranché permettant de conclure qu'un dysfonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique soit un élément central de la dépression majeure.

#### *3.2.4 Testostérone et sexualité.*

Les hommes hypogonadiques ont une activité sexuelle et une libido très inférieures aux sujets sains (*Skakkebaek et al. 1981*). L'hypogonadisme est une cause peu commune d'un dysfonctionnement érectile qui est plus fréquemment le résultat d'une pathologie vasculaire ou psychologique (*Feldman et al. 2002*). Lorsque l'impuissance est traitée par une thérapie n'incluant aucune supplémentation hormonale (i.e traitement psychiatrique ou chirurgical), on constate une augmentation de l'activité sexuelle et dans le même temps, les niveaux de testostérone endogène relevés chez ces patients sont aussi en augmentation, et ceci quelque soit le type de thérapie utilisée (*Jannini et al. 1999*). De plus, même de grandes études transversales n'ont pas réussi à mettre en évidence un lien irréfutable entre une testostéronémie endogène faible et les dysfonctions érectiles ou la libido (*Krause and Muller 2000*). Par contre, les changements de concentration de l'hormone peuvent expliquer de façon convaincante les variations de l'activité sexuelle relevées chez les hommes âgés en bonne santé (*Davidson et al. 1983b*). Les études apparaissent donc contradictoires sur de nombreux points, rendant difficile l'appréciation objective de l'influence de la concentration en androgènes sur le comportement sexuel des sujets étudiés.

#### *3.2.5 Testostérone et maladies cardio-vasculaires.*

Les effets de androgènes sur les lipides ont été bien étudiés parce qu'ils pourraient expliquer la plus grande prévalence des maladies athérosclérotiques chez les hommes comparativement aux femmes. Pourtant, de nombreuses études rapportent une association entre un taux faible en testostérone totale et un profil

lipidique athérogénique, suggérant des effets cardioprotecteurs pour les androgènes (Zmuda *et al.* 1997). Ces résultats surprenants peuvent néanmoins s'expliquer par la multitude de variables interdépendantes impliquées dans ces analyses. Par exemple, le pourcentage de fumeurs est beaucoup plus important parmi les patients dotés de fortes testostéronémies. Dans une étude portant sur plus de 500 hommes en bonne santé, les auteurs ont montré que 63% des sujets situés dans le quart supérieur de la gamme des concentrations en testostérone étaient fumeurs, alors que 33% le sont parmi les patients du quart inférieur (Gyllenborg *et al.* 2001). Or l'influence néfaste du tabac sur les risques cardiovasculaire a été clairement démontrée.

La testostérone pourrait aussi influencer la formation de la plaque d'athérome par des mécanismes lipides indépendants. Il existe des séquences CAG polymorphiques dans le gène codant pour le récepteur aux androgènes qui agissent sur le métabolisme des HDL (high density lipoprotein) mais aussi sur la vasoréactivité artérielle coronarienne (Zitzmann *et al.* 2001).

### 3.2.6 Testostérone et cancer de la prostate.

Une forte testostéronémie est considérée comme étant un facteur de risque pour les tumeurs prostatiques. De même, les polymorphismes dans les gènes codant notamment pour la 5 $\alpha$  réductase ou le nombre de séquences répétitives dans le gène codant pour le récepteur aux androgènes font partie des facteurs détectés chez les sujets à risques (Kantoff *et al.* 1997). On considère généralement que la DHT est plus impliquée que la testostérone dans la croissance tumorale. En effet, le finastéride, un inhibiteur de la 5 $\alpha$  réductase peut diminuer la taille de la prostate (McConnell *et al.* 1992). Lorsqu'un traitement est décidé chez un patient hypogonadique, on observe quasiment systématiquement une augmentation plasmatique des PSA (prostate specific antigen). Le déclenchement du processus tumoral ou son accélération suite à un traitement à base d'androgènes est par contre beaucoup moins bien documenté. Les antiandrogènes comme l'acétate de cyprotérone ou la flutamide sont prescrits si la tumeur est diagnostiquée mais les

cancers de la prostate peuvent évoluer vers un stade dit 'antiandrogènes indépendant'. Les cellules tumorales continuent alors leur multiplication même lorsque le récepteur aux androgènes est neutralisé. Ce mécanisme d'échappement n'est pas encore bien caractérisé et de nombreuses équipes tentent encore d'élucider les interactions moléculaires responsables de cet événement.

### 3.2.7 Tissus osseux.

L'action des androgènes au niveau de l'os est plus claire. Une puberté tardive chez les garçons induit une diminution de la minéralisation osseuse au cours de la vie adulte (*Finkelstein et al.* 1998). Les hommes souffrant d'hypogonadisme montrent un risque accru de fractures (*Swartz and Young* 1988). Les androgènes et la testostérone en particulier apparaissent donc comme un élément essentiel à un bon remodelage osseux.

Deux études ont permis de déterminer le mécanisme sous-jacent à l'effet des androgènes sur le remodelage osseux. En 1994, le groupe de Korach aux Etats-Unis a observé un patient de 28 ans qui présentait une mutation d'une seule base sur les deux allèles du gène codant pour le récepteur aux œstrogènes. La protéine obtenue après transcription et traduction était tronquée et non fonctionnelle (*Smith et al.* 1994). Le patient avait un taux d'oestradiol 10 fois supérieur à la norme, une testostéronémie normale et un phénotype caractérisé par une grande taille (204 cm) due à une fusion incomplète des épiphyses malgré son âge de 28 ans. Sa densité osseuse était aussi très diminuée. Les marqueurs du remodelage osseux montrèrent un turn-over osseux accéléré caractérisé par une hyper-résorption et une augmentation de l'ostéocalcine ainsi que des phosphatases alcalines osseuses. Cette étude confirma donc que les œstrogènes ont un rôle important dans l'arrêt de la croissance après la puberté, mais aussi et surtout que les androgènes ne sont pas suffisants pour maintenir la densité osseuse chez l'homme.

En 1998, un autre cas fut décrit par l'équipe de Grumbach (*Bilezikian et al.* 1998). Il s'agissait d'un homme qui avait subi une mutation dans le gène codant pour l'aromatase qui permet de convertir la testostérone en oestradiol dans les tissus périphériques. Il était âgé de 24 ans, mesurait aussi 204 cm tout en ayant une densité osseuse très inférieure à la normale. Par contre, la quantité d'oestradiol dans le sang était très faible et la testostéronémie élevée. Ce patient a reçu un traitement à base d'œstrogènes conjugués qui lui a permis au bout de 18 mois de recouvrer des marqueurs du remodelage osseux normaux. La densité osseuse avait en outre augmenté de 15% après 3 ans. La testostérone peut donc agir physiologiquement au niveau du tissu osseux soit directement (le récepteur aux androgènes étant présent dans les trois types de cellules osseuses : ostéoblastes, ostéoclastes et ostéocytes) soit indirectement en s'aromatisant en oestradiol grâce à la P450<sub>aro</sub>. Une étude clinique datant de 1995 (*Watts et al.* 1995) montra l'effet d'un traitement aux œstrogènes, aux androgènes ou aux deux hormones combinées chez des femmes chirurgicalement ménopausées. Les résultats indiquèrent que chacun des deux premiers traitements était suffisant pour prévenir la perte de masse osseuse au niveau des hanches et de la colonne vertébrale, mais que seul le traitement combiné induisait une augmentation significative de la densité osseuse.

## 4 Hypothèse.

En constituant un facteur non négligeable de la minéralisation osseuse comme démontré précédemment, la testostérone participe donc individuellement au maintien de l'homéostasie calcique. Mais son action sur le tissu osseux est-elle la seule à modifier les flux calciques ? Nous avons vu que les androgènes possédaient des récepteurs dans un très grand nombre de tissus et notamment dans les reins. Les tubules rénaux en association avec l'intestin, sont les structures principales responsables de la réabsorption calcique. Les androgènes auraient-ils la capacité d'influencer cette réabsorption ? Cette question revêt toute son importance dans le cadre d'une supplémentation thérapeutique en androgènes. En effet, nous venons de discuter de la baisse de la concentration en testostérone avec l'âge et de ses conséquences. Sur certains aspects, notamment la baisse de densité osseuse ou les états dépressionnaires, fournir un complément androgénique aux patients semble constituer une réponse appropriée mais quelles en seraient les conséquences sur le métabolisme calcique et notamment sa réabsorption ?

Nous savons que les androgènes peuvent agir indépendamment de leurs récepteurs, d'une manière non génomique. En outre cette hormone est capable de générer des flux calciques dans un grand nombre des cellules aussi diverses que les ostéoblastes, les cellules musculaires ou les lymphocytes T. Ce projet va donc nous permettre de déterminer si les androgènes sont susceptibles de moduler la réabsorption calcique au niveau du néphron et de quelle façon ils agissent. Pour répondre à ces questions nous nous sommes fixé cinq objectifs :

- 1) Définir les effets de la DHEA, de la testostérone et de la DHT sur le transport calcique rénal
- 2) Déterminer quels sont les paramètres cinétiques des flux calciques détectés à travers la membrane plasmique apicale des cellules du néphron lorsque celles-ci sont traitées à la testostérone.

3) Déterminer quel type de canal est impliqué dans le transport de calcium induit par les androgènes.

4) Définir le mode d'action des androgènes sur le néphron et, le cas échéant, situer les androgènes au sein de la classification de Mannheim.

5) Préciser la nature des messagers et des molécules intermédiaires impliqués dans le phénomène étudié.



## II MATÉRIELS ET MÉTHODES.

### 1 Effets de la testostérone sur la réabsorption calcique.

#### 1.1 Préparation des tubules.

Les suspensions enrichies de tubules proximaux et distaux de lapin ont été préparées selon la méthode décrite originellement par (Vinay *et al.* 1981) et modifiée par (Bouhtiauy *et al.* 1991). Les reins de lapins New Zealand sont excisés et les capsules rénales sont enlevées. Ensuite, les cortex rénaux sont tranchés et suspendus pendant 20 min à 37°C sous forte agitation dans une solution de Krebs-Henseleit oxygénée avec 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> et supplémentée avec 10mM de glutamine, 1mM d'acide glutamique, 1 mM d'acide pyruvique, 10 mM d'acide lactique 0,5% BSA et 1mg/ml de collagénase type V.

Après la digestion, les suspensions sont passées à travers un filtre métallique pour enlever les gros débris, et ensuite, à travers un filtre de 250 µm pour éliminer la majeure partie des glomérules. Le filtrat est ensuite centrifugé à 200 x g pendant 20 sec et lavé avec une solution Krebs-Henseleit (NaCl 138mM, mannitol 58mM, NaHCO<sub>3</sub> 24,8 mM, KCl 3,8 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,39 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,38 mM et CaCl<sub>2</sub> 1,17 mM) jusqu'à ce que le surnageant soit clair. Le culot de la dernière centrifugation est resuspendu dans une solution Krebs-Henseleit modifiée contenant du Percoll 40% (v/v) également oxygénée avec 95%O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>. Cette suspension est centrifugée pendant 30 min à 28 000 x g à 4°C dans un rotor Sorvall SM-24. Trois bandes sont habituellement observées à la fin de cette centrifugation: 1) dans la région supérieure du tube, une bande enrichie en segments distaux du néphron; 2) Immédiatement en dessous, une bande rougeâtre constituée par les glomérules; 3) dans la région inférieure du tube, une troisième et dernière bande de taille importante enrichie en tubules proximaux. Les bandes contenant les tubules proximaux et distaux sont récoltées séparément, d'abord lavées deux fois, dans une solution Krebs-Henseleit

contenant 0,5% BSA et une dernière fois dans une solution Krebs-Henseleit non supplémentée en BSA de manière à se débarrasser du Percoll.

Après ces lavages, il est important d'observer les tubules au microscope de manière à évaluer la nature et la qualité des suspensions de tubules purifiés. Après s'être assuré de l'identité des segments tubulaires obtenus, une incubation de ceux-ci avec la testostérone ou des agents comme la cycloheximide ou le Rp-AMPC, qui nécessitent la présence des constituants cytosoliques pour agir, est effectuée sur les tubules intacts isolés durant un temps défini dans l'expérience. Les tubules sont ensuite resuspendus dans une solution constituée de mannitol 10 mM et de Tris-Hepes 20 mM pH 7,4, et congelées à -80°C jusqu'au jour de l'expérience.

## **1.2 Préparation des membranes lumbales.**

Les membranes lumbales ont été préparées respectivement à partir des suspensions de tubules proximaux et distaux, à l'aide d'une technique de précipitation au  $MgCl_2$  déjà publiée (*Lajeunesse and Brunette 1991*), et modifiée à partir de la méthode originale de Booth et Kenny (*Booth and Kenny 1974*). Après l'homogénéisation des suspensions de tubules avec 10 coups d'homogénéisateur Dounce de type serré, 12 mM de  $MgCl_2$  (concentration finale) est ajouté aux homogénats afin de se débarrasser, par précipitation, des membranes basolatérales, des glomérules, et des organelles intracellulaires contaminants. Cette méthode est basée sur l'agrégation préférentielle des autres structures cellulaires par des ions métalliques divalents ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ). Après avoir agité sur glace pendant 10 ou 20 minutes pour les tubules proximaux et distaux respectivement, les suspensions sont centrifugées à 3 000 x g pendant 20 minutes à 4°C. Ensuite, les surnageants sont récoltés et centrifugés à 28 000 x g pendant 20 minutes à 4°C. Les culots ainsi formés sont lavés deux fois de la même façon avec une solution de mannitol 280 mM, Tris-Hepes 20 mM à pH 7,4. A la fin, les culots membranaires sont resuspendus dans la même solution et laissés sur glace

pendant une heure après trois passages dans une seringue à insuline de 1ml dotée d'une aiguille de jauge 26 x 0,5.

### **1.3 Mesure de l'activité des marqueurs enzymatiques**

#### *1.3.1 Activité de la phosphatase alcaline.*

Nous avons mesuré l'activité de la phosphatase alcaline par la méthode de Kelly et Hamilton (*Kelly and Hamilton 1970*). Cette méthode utilise l'hydrolyse enzymatique du p-nitrophényl phosphate en p-nitrophénol, lequel est mesuré par spectrophotométrie à 410 nm.

##### 1.3.1.1 Solutions utilisées

Substrat : une solution de p-nitrophényl phosphate 32 mM est préparée en dissolvant 66,7 mg de p-nitrophényl phosphate dans 5 ml d'eau bidistillée. Cette solution est conservée à l'abri de la lumière et doit être préparée le jour du dosage.

Standards de p-nitrophénol : une solution mère de p-nitrophénol est préparée comme suit : 1 ml de p-nitrophénol 10 mM est dilué dans 99 ml de NaOH 50 mM. A partir de cette solution mère, nous préparons des solutions de 10, 20, 40 et 60  $\mu$ M en diluant à 10 ml avec du NaOH 50 mM des parties aliquotes de 1, 2, 4 et 6 ml. L'absorbance de chacune de ces solutions est lue à 410 nM et une courbe standard est construite.

Tampon propanol pH 10 : ce tampon est préparé en mélangeant 137,7 g de 2-amino-2 méthyl-1 propanol avec 500 ml d'eau bidistillée. 131,4 ml de HCL 5N sont ensuite ajoutés et le volume est complété à 1 litre avec de l'eau bidistillée. Le pH est ajusté à 10 avec du HCl 5N.

#### 1.3.1.2 Méthode.

Des volumes égaux de substrat de tampon propanol pH 10 sont mélangés. Des parties aliquotes de 450  $\mu$ l de ce mélange sont distribuées dans des tubes en verre ( 16 x 100 mm) et placés dans un bain-marie à 37°C. Des parties aliquotes de 50  $\mu$ l d'une dilution au 1/500 des échantillons à doser sont ajoutés à chaque tube. Après 15 min d'incubation, la réaction est arrêtée par addition de 4,5 ml de NaOH 50 mM. L'absorbance est ensuite lue à 410 nm. La quantité de p-nitrophénol formée est déterminée directement sur la courbe standard. L'activité est exprimée en  $\mu$ moles de p-nitrophénol formées par minute et par mg de protéines.

#### 1.3.2 *Activité de la $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase.*

Cette quantification a été effectuée en mesurant l'activité ATPasique sensible à la ouabaïne des suspensions membranaires comme décrit par Post et Sen (*POST and SEN* 1965).

##### 1.3.2.1 Solutions utilisées.

Solution d'ATP 15 mM : 1 gr d'ATP est dissout dans 25 ml de NaOH 0,25 N. Le pH est ajusté à 7,4.

Solution de ouabaïne : 3,65 mg de ouabaïne sont dissouts dans un tampon (tris 60 mM,  $\text{MgCl}_2$  6mM, NaCl 240 mM, KCl 40 mM). La solution de ouabaïne 5 mM ainsi obtenue est ajustée à un pH de 7,40.

Réactif phosphate inorganique (Atkinson) : 5 % de cirrasol ALM-WF sont dissous dans de l'eau bidistillée chauffée + Une solution de molybdate d'ammonium à 2% ( $(\text{NH}_4)_2 \text{MO}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) dans  $\text{H}_2\text{SO}_4$  est préparée en parallèle (solution 2). Le réactif d'Atkinson est ensuite obtenu en mélangeant 10 volumes de 1 avec 25 volumes de 2, en présence de 65 volumes d'eau bidistillée.

Solution de phosphate inorganique : une solution aqueuse à 20 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  est préparée. Après dilutions en série, elle permettra de construire la courbe standard nécessaire à l'interprétation des résultats.

#### 1.3.2.2 Méthode

Les échantillons sont solubilisés dans une solution de déoxycholate 0,8%, à raison de 50  $\mu\text{g}$  pour 300  $\mu\text{l}$ , en présence ou en absence de ouabaïne, inhibiteur spécifique de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase. On ajoute ensuite la solution d'ATP et l'ensemble est mis à incuber 20 minutes à température ambiante. La réaction est arrêtée par l'addition d'1 ml de TCA 10%, suivi d'une centrifugation. A 1 ml de surnageant sont ajoutés 2 ml du réactif d'Atkinson froid. Après 10 minutes d'incubation, les densités optiques obtenues sont lues à une longueur d'onde de 390 nm. Les résultats sont comparés à ceux obtenus à partir des dilutions standard (0,2; 0,4; 0,6; 0,8 et 1  $\mu\text{moles/l}$ ) de la solution mère de phosphate inorganique.

La  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase est une enzyme spécifique des membranes cellulaires basolatérales et la phosphatase alcaline est exclusivement présente sur les membranes du tubule proximal. En combinant ces deux marqueurs, nous pouvons avoir une idée assez précise de la pureté de nos préparations. Les valeurs obtenues au cours de cette étude sont présentées dans la table 2.

	Phosphatase alcaline (nM/μg/15min)	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase (nM/μg/20min)
<b>Cortex total</b>	1,10±0,14	4,40±0,16
<b>Membranes lumineales proximales</b>	11,33±0,86 (X 10,3)	2,63±0,39 (X 0,53)
<b>Membranes lumineales distales</b>	2,23±0,27 (X 2,02)	0,40±0,11 (X 0,1)

Table2 : Activités enzymatiques dans les différentes préparations. X : enrichissement comparé aux valeurs obtenues pour le cortex. Indice de pureté des membranes.

#### 1.4 Mesure du transport de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ par les vésicules lumineales.

Le transport du  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  a été mesuré à l'aide de la technique de filtration rapide sur filtre millipore. Le transport est initié en ajoutant 25 μl de milieu d'incubation (MI) contenant 141 mM Chlorure de choline, 20 mM Tris-Hepes, 0,5 mM  $\text{CaCl}_2$ ,  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , à 35°C, pH=7,4 à 5 μl de suspension membranaire (15-30 μg de protéines). Le MI peut aussi être supplémenté avec différents inhibiteurs, notamment dans la série d'expériences que nous avons réalisée dans le but d'identifier le ou les canaux calciques impliqués dans le transport de calcium par la testostérone. Au bout d'un temps d'incubation donné, toujours à 35°C, le transport est arrêté en déposant directement la suspension sur un filtre millipore (0,45 μm) préalablement humecté avec le tampon d'arrêt glacé (150 mM KCl, 20 mM Tris-Hepes, 2 mM EGTA, pH 7,4)

#### 1.5 Validations statistiques.

Les données présentées dans cette étude sont exprimées sous la forme de la moyenne ± écart-type. La comparaison et le cas échéant la signification de ces moyennes l'une par rapport à l'autre a été étudié en utilisant le test t de Student bilatéral pour valeurs non appariées. La différence était considérée statistiquement

différente quand la probabilité était plus petite que 0,05. Les paramètres cinétiques du transport de calcium à deux composantes par les membranes lumineales distales ont été représentés selon la représentation d'Eadie-Hofstee. Ils ont été calculé en utilisant les équation décrites par Huntson en 1975 (*Huntson D.L* 1975)

## **1.6 Matériels**

La testostérone nous a été gracieusement fournie par Serva Biochemical reagents (Islandia, NY, USA). Les réactifs ont été acquis auprès de Sigma-Aldrich Fluka (Oakville, ON, Canada). Le  $^{45}\text{CaCl}_2$  provient de la compagnie Dupont New England Nuclear Co. (Boston, MA, USA) et les inhibiteurs de canaux calciques sont issus du catalogue de la compagnie Calbiochem.

## **2. Identification des messagers impliqués.**

### **2-1 Culture des cellules MDCK**

Les cellules MDCK sont décongelées en les plongeant 15 min dans un bain-marie à 37°C. Elles sont ensuite mises en culture dans des pétris 60 mm. Le milieu utilisé est du DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) supplémenté par 10% de sérum de veau foetal et 1% d'une solution de pénicilline streptavidine. Les cellules sont mises en incubateur à 37°C et 5%  $\text{CO}_2$  pendant trois jours de façon à obtenir un degré de confluence d'environ 80%. Elles sont alors soumises à l'action d'une solution de trypsine 0,25% et 1 mM EDTA. Après 20 minutes d'incubation, les cellules sont assez détachées pour les compter et effectuer un passage. L'ensemencement suivant se fait avec un nombre suffisant de cellules pour obtenir le même degré de confluence trois jours plus tard.

## 2.2 Validation du modèle des cellules MDCK en culture

200 000 cellules MDCK sontensemencées (MEM, 10% sérum, 1% pénicilline streptavidine) dans des plaques 6 puits comportant des inserts dotés de pores de 3  $\mu\text{m}$ . Après avoir vérifié leur confluence après 4 jours de culture, les cellules sont lavées avec un tampon (NaCl 136 mM, Hepes 16,5 mM, KCl 5,4 mM,  $\text{CaCl}_2$  0,1 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 mM, pH=7,4). Les inserts sont ensuite transférés dans une autre plaque de 6 puits contenant le milieu d'incubation (DMEM, testostérone  $10^{-10}\text{M}$ ) dans le compartiment inférieur des puits. Les pores pratiqués dans les inserts permettent au milieu de culture de baigner le pôle apical des cellules puisque lorsque celles-ci sont confluentes, elles s'organisent naturellement en culture polarisée. Le milieu est aspiré après 5 min de traitement et remplacé par une solution saline NaCl 0,9%. L'expérience débute en ajoutant 1 ml de MI directement sur les cellules pendant 20 secondes. Après aspiration de cette solution, les cellules sont rincées 3 fois avec le tampon d'arrêt précédemment décrit. Les inserts sont alors placés dans des vials à scintillation de façon à compter la radioactivité emprisonnée dans les cellules. Pour chaque plaque, un contrôle est effectué en ajoutant le milieu radioactif aux cellules et en l'aspirant immédiatement, de façon à mesurer la radioactivité non spécifique fixée sur les cellules.

## 2.3 Western Blot

### 2.3.1 Préparation des extraits protéiques cellulaires

Les pétris arrivés à 80% de confluence sont traitées avec 20  $\mu\text{l}$  d'éthanol contenant  $10^{-7}\text{M}$  de testostérone. La concentration finale de l'hormone au contact des cellules est donc de  $10^{-10}\text{M}$ . Un autre pétri contrôle reçoit 20  $\mu\text{l}$  d'éthanol seul. Les cellules sont ensuite mises à incuber 5 minutes à 37°C et 5%  $\text{CO}_2$ . Les cellules sont récoltées à l'aide d'un couteau plastique, directement dans le milieu de culture, et centrifugées 1 minute de façon à isoler le culot cellulaire. Dans chacun des tubes



sont ensuite ajouté pendant 1 minute 200 µl de tampon de lyse ( 20 mM Tris, 1 mM EGTA, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 25 mM NaF, 0,5% triton X-100, 10 mg/ml apoptotine, 10 mg/ml chymostatine, 10 mM leupeptine, 10 mM pepstatine A). Après une nouvelle centrifugation, 90 µl du surnageant sont prélevés à partir desquels 4 µl de chaque échantillon sont utilisés pour mesurer la quantité de protéines présente (kit Bio-Rad Protein Assay). Le tampon de chargement 3X est ensuite ajouté. Les échantillons sont une nouvelle fois centrifugés puis dénaturés en les plaçant 10 min à 90°C. Ils sont maintenant prêts à être déposés sur le gel d'acrylamide ou bien congelés à -20°C.

### *2.3.2 Migration sur gel, transfert sur membrane PVDF et révélation.*

Un minigel à 10% d'acrylamide est préparé de la façon suivante : 4 ml H<sub>2</sub>O, 3,3 ml d'une solution d'acrylamide à 30%, 2,5 ml d'une solution tris 1,5 mM (pH 8,8), 100 µl de SDS 10%, 4 µl de TEMED et 100 µl d'APS à 10%. Les échantillons sont chargés dans les puits et la migration se fait d'abord à 70 volts pour permettre aux protéines de pénétrer le gel puis à 100 volts pendant 2 heures.

Le gel est ensuite disposé sur son support d'éponge garni de papier Whatman. Une membrane PVDF est préparée dans le même temps en la plongeant dans le méthanol puis dans le tampon de transfert (20 mM Tris, 150 mM glycine, 4 volumes H<sub>2</sub>O, 1 volume éthanol). La membrane est plaquée sur le gel et le transfert des protéines est effectué durant une nuit sous 125 mA d'intensité de courant.

La membrane est ensuite bloquée dans le tampon de blocage (TBS-tween 1X, 5% de lait non gras), sous agitation lente et à 4°C. La membrane est ensuite scellée dans un sac plastique et l'anticorps primaire est ajouté (1/1000) (Ac anti-ERK et anti-phospho ERK, Cell Signaling, Pickering, On). L'incubation s'effectue pendant une nuit sous agitation lente. Puis trois lavages au tampon TBS-tween sont effectués, chacun durant 15 min. La membrane est alors incubée en présence de l'anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps primaire et couplé à une peroxydase (Ig G anti-lapin, Cell Signaling, Pickering, On). Il est dilué (1/2000) dans le tampon de blocage

et mis en présence de la membrane durant 4 heures. Elle est ensuite lavée 3 fois au TBS-tween.

La visualisation des résultats se fait en couvrant la membrane avec le réactif lumi-light (Roche, Laval, Qc, Canada) qui contient du luminol émettant de la lumière à 425 nm lorsqu'il est métabolisé par la peroxydase. En veillant à ne pas laisser sécher la membrane, celle-ci est exposée 30 secondes à un film sensible à la lumière.

### *2.3.3 Stripping de la membrane*

Il est possible d'enlever complètement les deux anticorps fixés à la membrane dans le but d'effectuer un second marquage sur la même membrane. Pour se faire, la membrane est plongée successivement dans les solutions suivantes : 1) 1M Tris pH 6,7 2) 10% SDS 3) H<sub>2</sub>O bidistillée 3)  $\beta$  mercaptoéthanol. Elles sont ensuite scellées dans un sac plastique placé dans un bain-marie à 50°C durant 30 min. Puis elles sont à nouveau bloquées et l'immunodétection peut être effectuée selon le protocole décrit ci-dessus.

## **2.4 Cytométrie en flux**

Les cellules MDCK en culture sont stimulées par la testostérone diluée dans l'éthanol ( $10^{-10}$ M final) durant 5 min à 37°C. Le contrôle reçoit uniquement le même volume d'éthanol. Les pétris sont ensuite placés immédiatement sur la glace. Le milieu est enlevé et les cellules sont rincées avec une solution saline PBS EDTA 1 mM. 500  $\mu$ l de trypsine-EDTA 5X sont ajoutés et les pétris sont remis dans l'incubateur 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Les cellules se décollent après 5 min de ce traitement, la trypsine est alors neutralisée par 500  $\mu$ l de DMEM supplémenté avec 10% de sérum. Les cellules en suspensions sont transférées dans un tube de polypropylène et passées plusieurs fois à travers une aiguille de calibre 26G afin de les individualiser au maximum. Elles sont ensuite comptées à l'aide d'un hématimètre. 100  $\mu$ l/ml d'une

solution de formaldéhyde à 16% sont ajoutés, de façon à obtenir une concentration finale de 2%. La fixation se fait durant 15 min à 4°C. Les cellules sont aliquotées par tranches de 100 000 et déposées dans les tubes à FACS, toujours à 4°C. Les culots cellulaires sont récupérés par centrifugation (500 x g, 5 min), et plongés dans 1 ml d'éthanol (-20°C) en même temps que les tubes sont vortexés doucement. Les cellules sont laissées à se perméabiliser 15 min sur la glace. Puis elles sont lavées deux fois avec 3 ml de PBS. Elles sont alors resuspendues dans le tampon de marquage (PBS 1X, 4% sérum de veau foetal). L'anticorps primaire, obtenu chez le lapin, est ajouté à la suspension et incubé 30 min à température ambiante pour qu'il puisse pénétrer correctement dans les cellules et se fixer à son épitope : ERK phosphorylé ou MEK phosphorylé. Un lavage au PBS est ensuite effectué. Le culot cellulaire est resuspendu dans 200 µl de tampon de marquage et l'anticorps secondaire est ajouté; il s'agit d'un fragment F(ab')<sub>2</sub> couplé au FITC, synthétisé chez le singe et dirigé contre les immunoglobulines de lapin. L'incubation de 15 min se fait aussi à température ambiante mais à l'abri de la lumière. Les cellules sont lavées 2 fois dans le PBS et resuspendues dans 100 µl de PBS-EDTA juste avant l'analyse au FACS (FACSort, Becton-Dickinson, San-Jose, CA, USA).

## RÉSULTATS

### 1 Effets de la testostérone sur le transport de $\text{Ca}^{2+}$ par les membranes luminales des cellules du tubule contourné proximal

#### 1.1 Transport de calcium en fonction du temps

Les effets de la testostérone sur le transport de calcium par les membranes luminales des tubules proximaux ont été étudiés en utilisant 0,5 mM de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  comme traceur. La figure 8 représente les résultats des expériences où les tubules ont été traités pendant 5 minutes à 37°C avec  $10^{-10}\text{M}$  testostérone diluées dans du méthanol. Le contrôle a reçu du méthanol seul. Le transport de calcium n'est pas modifié en présence de l'hormone dans ce segment du néphron puisqu'il passe de  $0,25 \pm 0,08$  (contrôle) à  $0,20 \pm 0,07$  pmol/ $\mu\text{g}/10\text{s}$  (traité),  $n=3$

Nous avons donc voulu vérifier si la testostérone était capable d'agir à une concentration différente de la concentration physiologique de  $10^{-10}\text{M}$ .

#### 1.2 Courbe dose-réponse

Nous avons fait varier la concentration de testostérone dans une gamme allant de  $10^{-10}\text{M}$  à  $10^{-6}\text{M}$ . La figure 9 montre qu'aucune de ces concentrations ne permet à l'hormone d'influencer le transport de calcium. Le tubule contourné proximal ne semble donc pas être sensible à la testostérone pour le transport de calcium.

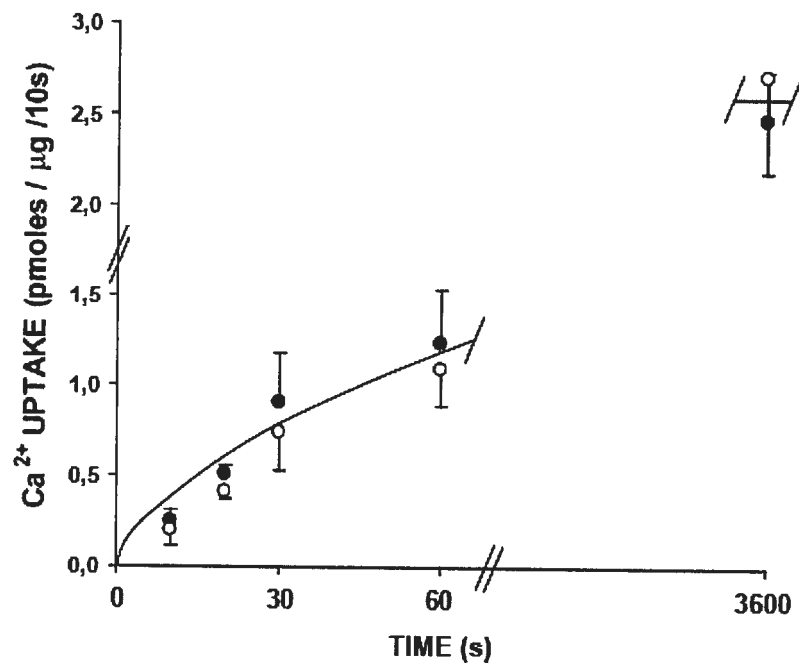


Figure 8 : Effet de la testostérone ( $10^{-10}$ M) après une incubation de 5 min à 37°C sur le transport de calcium (0,5 mM) par les membranes luminales du tubule proximal.  $\text{Na}^+=0$ . Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  la déviation standard. (●) tubules contrôles; (○) tubules traités à la testostérone.  $n=3$ .

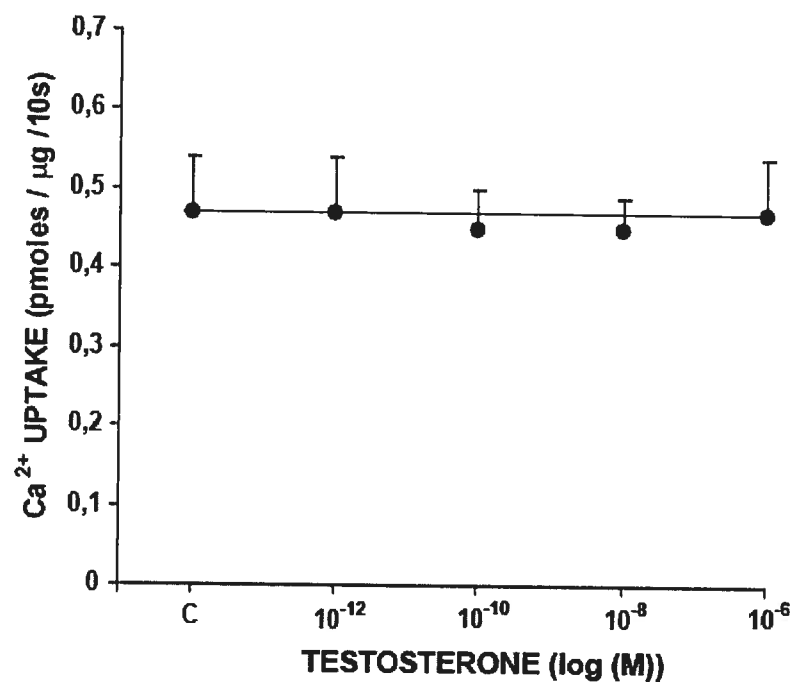


Figure 9 : Effet de la testostérone (5 min d'incubation à 37°C) sur le transport de calcium (0,5 mM) par les membranes lumineales du tubule proximal. Courbe dose-réponse. Na<sup>+</sup>=0. Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  la déviation standard. n=3.

## **2 Effets des androgènes sur le transport de $\text{Ca}^{2+}$ par les membranes luminales des cellules du tubule contourné distal.**

### **2.1 Transport de calcium en fonction du temps, en présence ou en absence de sodium**

Les mêmes expériences ont été réalisées dans le tubule distal. Cette fois, la testostérone ( $10^{-10}\text{M}$ ) provoque une augmentation du transport de calcium (0,5M) puisqu'il varie de  $0,61 \pm 0,08$  à  $0,87 \pm 0,08$  pmol/ $\mu\text{g}/10\text{s}$  ( $P < 0,05$ ,  $n=4$ ). La figure 10 montre que des résultats significativement différents pour le transport initial, après 10 sec et 20 sec d'incubation des vésicules en présence de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ .

Notre laboratoire a montré en 1992 (*Brunette et al.* 1992b) que la présence de sodium dans le milieu d'incubation diminuait sensiblement le transport calcique par les membranes luminales du tubule distal. Puisque la présence de sodium dans cette partie du néphron est physiologique *in vivo*, nous avons déterminé si l'effet de la testostérone perdurait dans ces conditions. Les résultats (figure 11) montrent clairement que malgré une importante baisse de la quantité de calcium transporté, la testostérone continuait à stimuler la réabsorption calcique : elle passe de  $0,45 \pm 0,01$  (contrôle) à  $0,56 \pm 0,04$  pmol/ $\mu\text{g}/10\text{s}$  en présence de l'hormone. ( $p < 0,05$ ,  $n=6$ )

### **2.2 Influence de la concentration en testostérone sur le transport de calcium**

Nous avons ensuite construit une courbe dose réponse. Les dilutions s'échelonnent de  $10^{-12}\text{M}$  à  $10^{-5}\text{M}$ . Les résultats sont présentés dans la figure 12. Il apparaît clairement que la concentration optimale de la testostérone pour notre modèle s'établit aux alentours de  $10^{-10}\text{M}$ , c'est à dire très proche de la concentration physiologique de testostérone biodisponible dans l'organisme. D'autre part, à mesure que la concentration augmente, l'effet de l'hormone disparaît suggérant un mécanisme de contrôle des effets de l'hormone dépendant de la concentration.

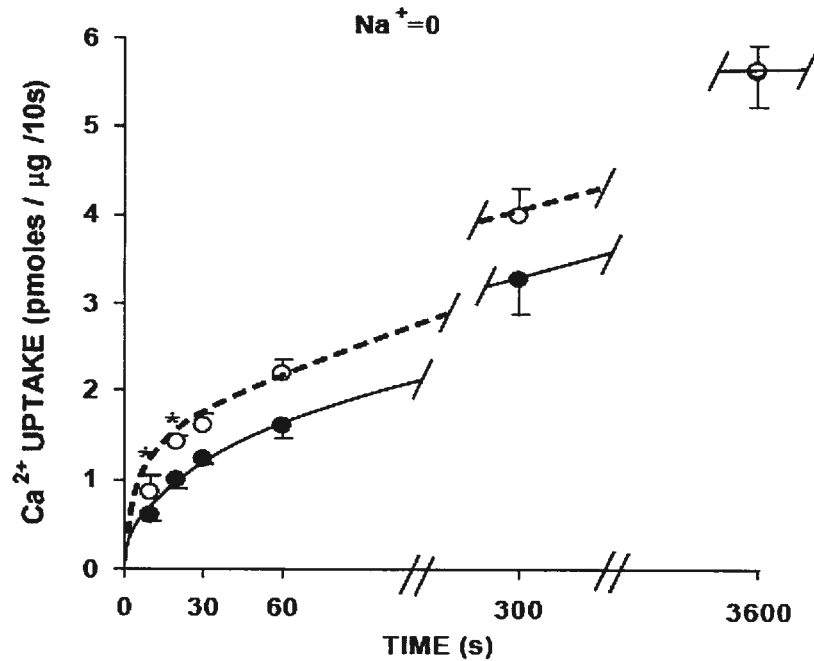


Figure 10: Effet de la testostérone ( $10^{-10}$ M) après une incubation de 5 min à 37°C sur le transport de calcium (0,5 mM) par les membranes lumineales du tubule distal.  $\text{Na}^+=0$ . Les données sont exprimées en moyennes  $\pm$  déviations standards. \*  $P < 0,05$  comparé aux valeurs contrôles. (●) tubules contrôles; (○) tubules traités à la testostérone.  $n=4$ .



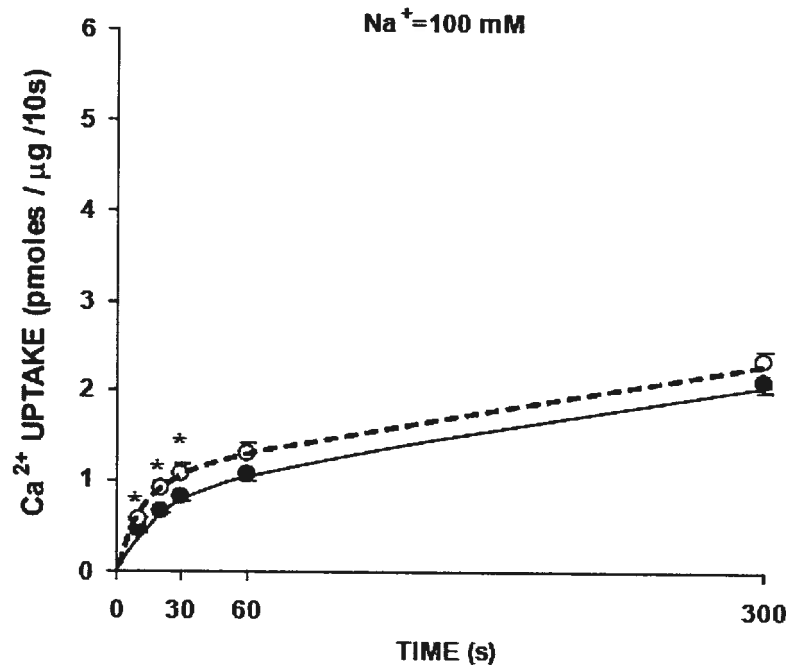


Figure 11: Effet de la testostérone ( $10^{-10}\text{M}$ ) après une incubation de 5 min à  $37^\circ\text{C}$  sur le transport de calcium ( $0,5 \text{ mM}$ ) par les membranes lumineales du tubule distal.  $\text{Na}^+ = 100 \text{ mM}$ . Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  la déviation standard. \*  $P < 0,05$  comparé aux valeurs contrôles. (●) tubules contrôles; (○) tubules traités à la testostérone.  $n=6$ .

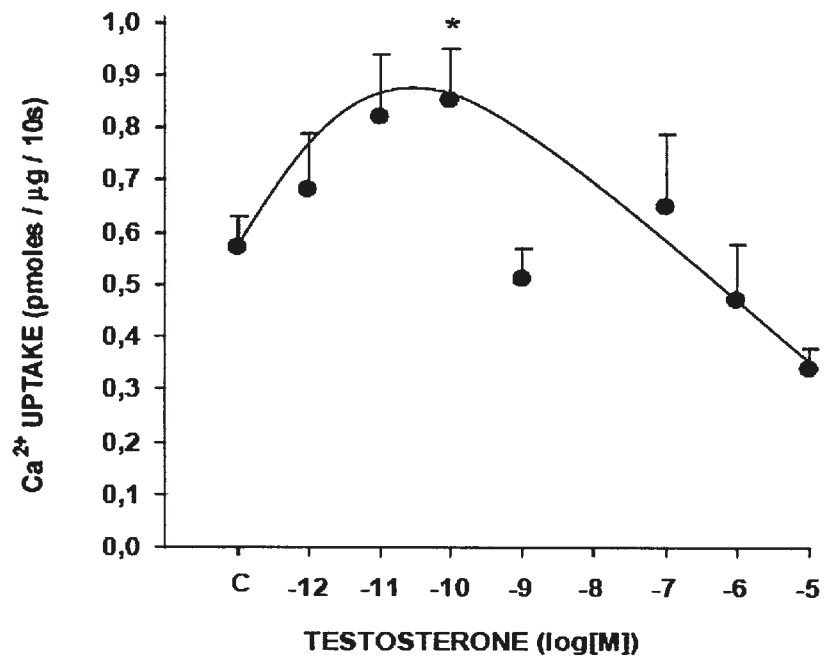


Figure 12 : Effet de la testostérone (5 min d'incubation, 37°C, en présence des tubules distaux) sur le transport de calcium (0,5 mM). Courbe dose-réponse. Na<sup>+</sup>=0. Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  la déviation standard. \* P<0,05 comparé aux valeurs contrôles. n=7.

### 2.3 Effet de la testostérone sur les paramètres cinétiques du transport de calcium

Dans les études récentes effectuées dans notre laboratoire, nous avons observé à plusieurs reprises l'existence d'au moins deux types de canaux calciques dans la membrane luminale des tubules distaux, arborant différents paramètres cinétiques (*Brunette et al.* 1992b), (*Brunette et al.* 2000), (*Brunette and Leclerc* 2001), (*Brunette et al.* 2004). Pour identifier lequel ou lesquels de ces paramètres sont influencés par la testostérone, nous avons fait varier la concentration de calcium dans le milieu d'incubation des vésicules de 0,025 à 4 mM. Puis, une courbe selon la représentation d'Eadie-Hofstee a été tracée. La figure 13 montre les droites obtenues par régression non linéaire nous permettant de quantifier les paramètres cinétiques étudiés. Les résultats exposés dans la table 2 démontrent que la testostérone agit sur la composante de basse affinité de la réabsorption calcique en augmentant le  $V_{max}$  de la réaction de  $2,11 \pm 0,12$  à  $3,15 \pm 0,29$  pmol/ $\mu$ g/10s sans modifier les valeurs de  $K_m$ . ( $p < 0,01$ ,  $n=6$ )

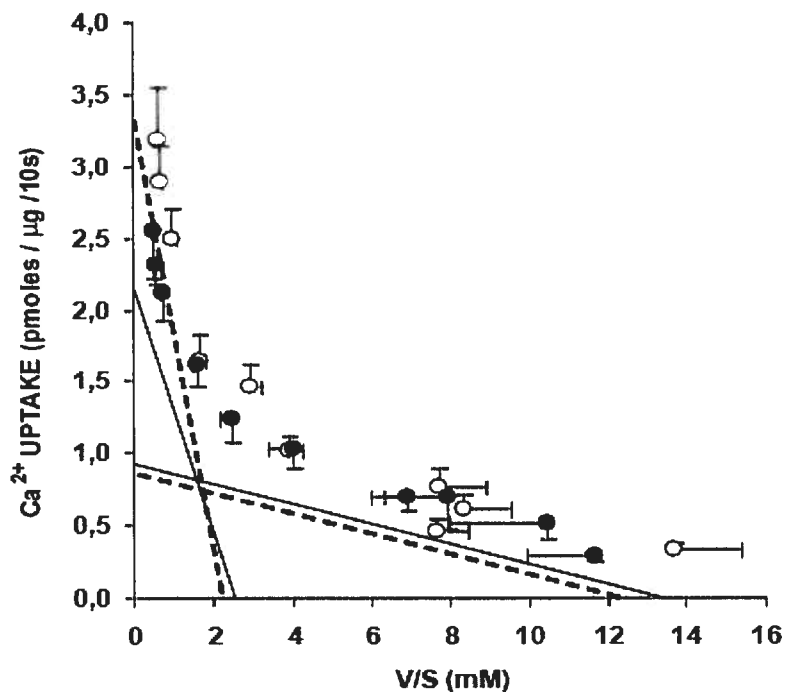


Figure 13 : Effets de la testostérone ( $10^{-10}\text{M}$ ) sur le transport de calcium (concentrations variables) par les membranes lumineales distales. (●) tubules contrôles; (○) tubules traités à la testostérone.  $n=6$ .

Paramètre cinétique	Affinité	Contrôle	Testostérone
Km (mM)	Basse	0,84±0,12	1,35±0,28
	Haute	0,061±0,01	0,065±0,01
Vmax (pmol/µg/10s)	Basse	2,11±0,12	3,15±0,29*
	Haute	0,82±0,019	0,84±0,20

Table 3 : Effet de la testostérone ( $10^{-10}$ M) sur les paramètres cinétiques du transport calcique par les membranes du tubule distal. \*  $P < 0,01$  comparé aux valeurs obtenues pour les vésicules membranaires issues des tubules non traités. Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  la déviation standard. n=6.

## **2.4 L'augmentation du transport de calcium par la testostérone se fait par l'intermédiaire de l'ouverture de canaux calciques voltages dépendants de type T**

Nous avons voulu ensuite définir quels étaient les canaux calciques impliqués dans cette variation du  $V_{max}$  de la composante de basse affinité du transport calcique dans les membranes lumineales distales. Différents inhibiteurs pharmacologiques ont donc été utilisés et ajoutés directement au contact des vésicules membranaires.

La première série d'expériences a été réalisée en présence de 50  $\mu$ M de diltiazem, inhibiteur spécifique des canaux calciques de type L. La présence de l'inhibiteur dans le milieu ne modifie pas l'augmentation du transport de calcium obtenue grâce à la testostérone :  $0,88 \pm 0,045$  pmol/ $\mu$ g/10s (testostérone seule) et  $0,91 \pm 0,005$  pmol/ $\mu$ g/10s (testostérone et diltiazem) (figure 14).

De même la figure 15 nous montre les résultats de l'expérience faite en présence de 10 nM d' $\omega$ -conotoxine MVIIIC, bloqueur des canaux de type P/Q. Là encore, les résultats sont comparables en absence ( $1,74 \pm 0,17$  pmol/ $\mu$ g/10s) ou en présence d'inhibiteur ( $1,49 \pm 0,10$  pmol/ $\mu$ g/10s )

A l'inverse, les expériences faites en utilisant  $10^{-6}$ M de mibéfradil, inhibiteur spécifique de la classe des canaux calciques de type T donnent des résultats significativement différents lorsque les tubules sont stimulés par la testostérone seule et lorsque le mibéfradil est présent dans le milieu. Le transport calcique chute de  $1,32 \pm 0,06$  pmol/ $\mu$ g/10s à  $0,84 \pm 0,12$  pmol/ $\mu$ g/10s ( $p < 0,01$ ,  $n=7$ ) (figure 16). L'augmentation du transport calcique par la testostérone se fait donc par l'intermédiaire de canaux de type T présents dans la membrane plasmique lumineale des cellules distales.

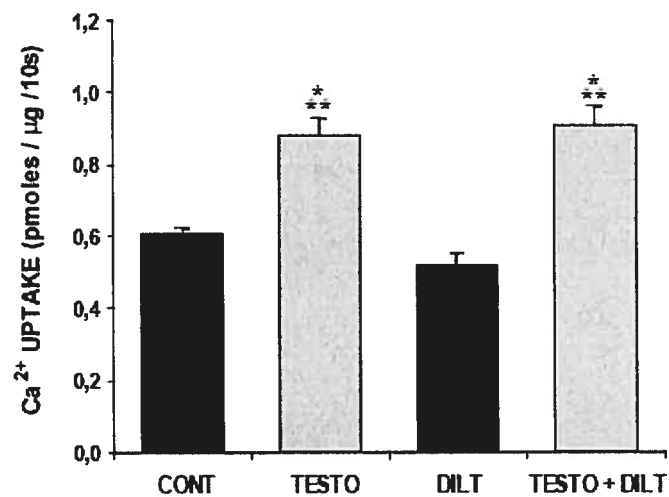


Figure 14 : Effet du diltiazem ( $50 \cdot 10^{-6} \text{M}$ ) sur le transport de calcium activé par la testostérone, à  $37^{\circ}\text{C}$ . Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  la déviation standard. . \* \* \*  $P < 0,01$  comparés aux valeurs contrôles.  $n=3$ .

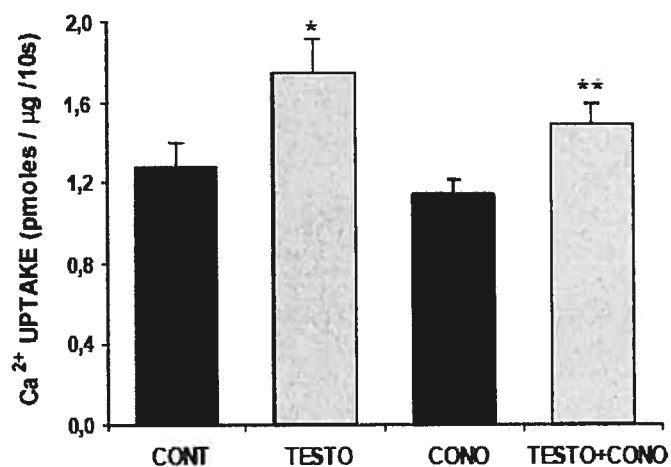


Figure 15 : Effet de l' $\omega$ -conotoxine MVIIC ( $100 \cdot 10^{-9} \text{M}$ ) sur le transport de calcium activé par la testostérone, à  $37^\circ\text{C}$ . Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  la déviation standard. . \*  $P < 0,05$ ; \* \* \*  $P < 0,01$  comparés aux valeurs contrôles.  $n=9$ .



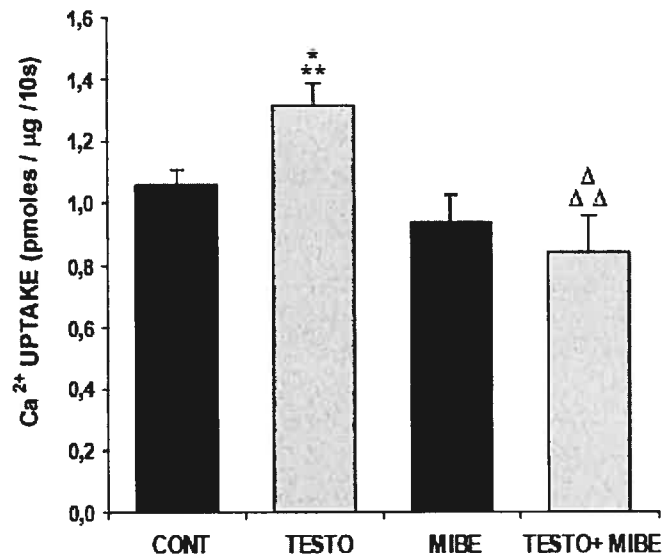


Figure 16 : Effet du mibéfradil ( $10^{-6}$ M) sur le transport de calcium activé par la testostérone, à 37°C. Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  la déviation standard. . \* \* \* P<0,01 comparés aux valeurs contrôles.  $\Delta \Delta \Delta$  P<0,01 comparés aux valeurs obtenues en présence de testostérone. n=7.

## **2.5 Effet de la dehydroépiandrosterone (DHEA) sur le transport de calcium**

Parmi les intermédiaires d'intérêt biologique présents dans la voie de synthèse de la testostérone décrite au paragraphe I.1.2, La DHEA occupe une place de choix puisqu'elle a été l'objet de nombreuses études, notamment sur ses éventuels effets anti vieillissement. Il nous est donc paru opportun de déterminer si cette molécule était aussi capable d'agir sur le transport de calcium dans le même segment du néphron que la testostérone. Nous avons fait varier la concentration de DHEA en présence de tubules distaux lors d'incubation de 5 min à 37°C. La figure 17 représente une courbe dose réponse s'échelonnant entre  $10^{-12}$ M et  $10^{-6}$ M. Tout comme la testostérone, la DHEA active le transport de calcium à une concentration de  $10^{-9}$ M. Pour des concentrations plus fortes, encore une fois, tout se passe comme si il existait un mécanisme inhibiteur de plus en plus actif à mesure que la quantité d'hormone augmente, destiné à atténuer les effets de la DHEA aux fortes concentrations.

## **2.6 Effet de la dihydrotestostérone (DHT) sur le transport de calcium**

La DHT est un métabolite très actif de la testostérone dans les cellules qui possèdent la  $5\alpha$  réductase. Elle est aussi capable de se fixer sur le récepteur aux androgènes AR. Dans ces conditions, cette molécule devrait aussi être capable d'activer le transport de calcium dans notre modèle. Or, de façon surprenante, la DHT n'a aucun effet sur le transport calcique (figure 18). La testostérone doit par conséquent agir selon un schéma particulier, que la structure même de la DHT l'empêche de reproduire. Les deux molécules diffèrent l'une de l'autre seulement par l'existence d'une double liaison dans le cycle A de la testostérone. Le phénomène que nous observons est donc sans aucun doute le résultat d'une interaction de la testostérone avec une structure réceptrice capable de reconnaître très finement son

ligand. En effet, même le récepteur aux androgènes (AR) peut se fixer de façon indifférenciée à la testostérone ou à la DHT.

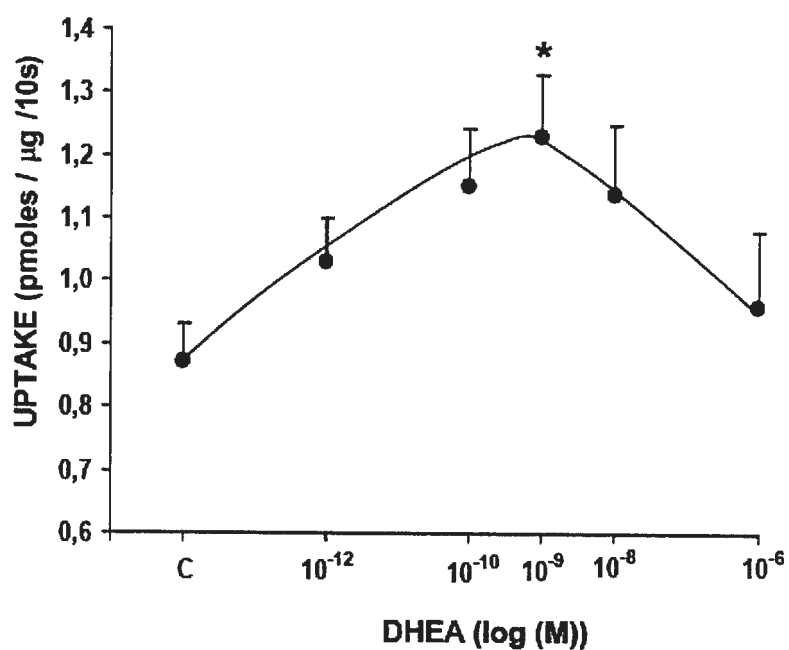


Figure 17 : Effet de la DHEA (5 min d'incubation, 37°C, en présence des tubules distaux) sur le transport de calcium (0,5 mM). Courbe dose-réponse.  $\text{Na}^+=0$ . Les données sont exprimées en moyennes  $\pm$  déviations standards. \*  $P<0,05$  comparé aux valeurs contrôles.  $n=3$ .

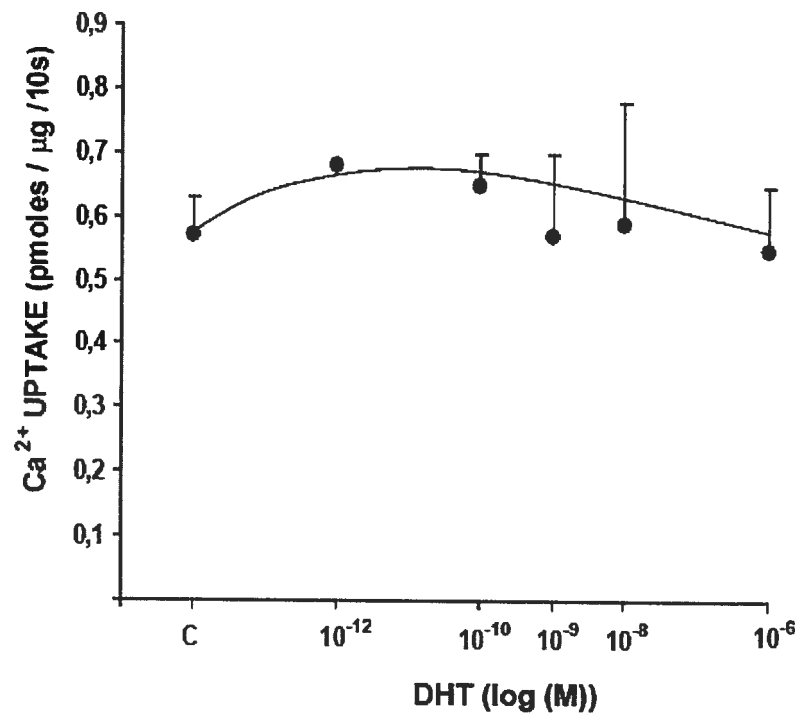


Figure 18 : Effet de la DHT (5 min d'incubation, 37°C, en présence des tubules distaux) sur le transport de calcium (0,5 mM). Courbe dose-réponse. Na<sup>+</sup>=0. Les données sont exprimées en moyennes  $\pm$  déviations standards. n=3.

## **2.7 La testostérone agit sur le transport de $\text{Ca}^{2+}$ par un mécanisme d'action non génomique**

### *2.7.1 Transport de $\text{Ca}^{2+}$ en fonction du temps d'incubation*

La plupart des hormones agissant sur la régulation du transport de calcium sur les membranes lumineales du tubule distal le font dans un délai relativement court, entre 1 et 15 min. Nous nous sommes donc demandé si la testostérone suivait ce mécanisme général. Nous avons donc réalisé des incubations de tubules distaux en présence de  $10^{-10}\text{M}$  testostérone durant des temps variables, allant de 1 à 30 min. Les résultats sont présentés dans la figure 19. L'effet maximum de l'hormone survient après 5 min d'incubation, représentant  $139,27 \pm 6,77\%$  par rapport au contrôle. Par la suite, à mesure que le temps s'accroît, le transport diminue jusqu'à atteindre le niveau du contrôle pour 30 min. Ce résultat est inattendu dans la mesure où l'hormone étudiée fait partie de la classe des stéroïdes qui agissent classiquement beaucoup plus lentement.

### *2.7.2 Effet direct de la testostérone sur les vésicules lumineales*

Les résultats précédents et notamment le fait que la testostérone puisse augmenter la réabsorption calcique après seulement 5 min d'incubation nous ont conduit à penser que cette hormone pourrait agir selon un mécanisme d'action différent de celui habituellement décrit pour les stéroïdes, nécessitant une synthèse protéique et donc un certain temps. Dans la figure 20, nous avons donc appliqué la testostérone directement sur les vésicules et non plus sur les tubules. Les résultats montrent que dans ces conditions, l'hormone n'a plus aucun effet. Il semble donc que certains composants intracellulaires soient nécessaires à l'action de la testostérone sur le transport calcique.

### *2.7.3 Transport de calcium et synthèse protéique*

Pour déterminer si les éléments intracellulaires nécessaires à l'effet de la testostérone incluent la machinerie de synthèse protéique, nous avons incubé des tubules distaux en présence de cycloheximide, qui est un inhibiteur de la transcription, et de testostérone. La figure 21 montre que la cycloheximide n'inhibe pas les effets de l'hormone :  $140,48 \pm 4,14\%$  de transport calcique par rapport au contrôle pour la testostérone seule et  $136,95 \pm 4,88\%$  pour les tubules traités avec la cycloheximide et la testostérone. La synthèse protéique ne semble donc pas être un élément crucial de la voie de signalisation étudiée.

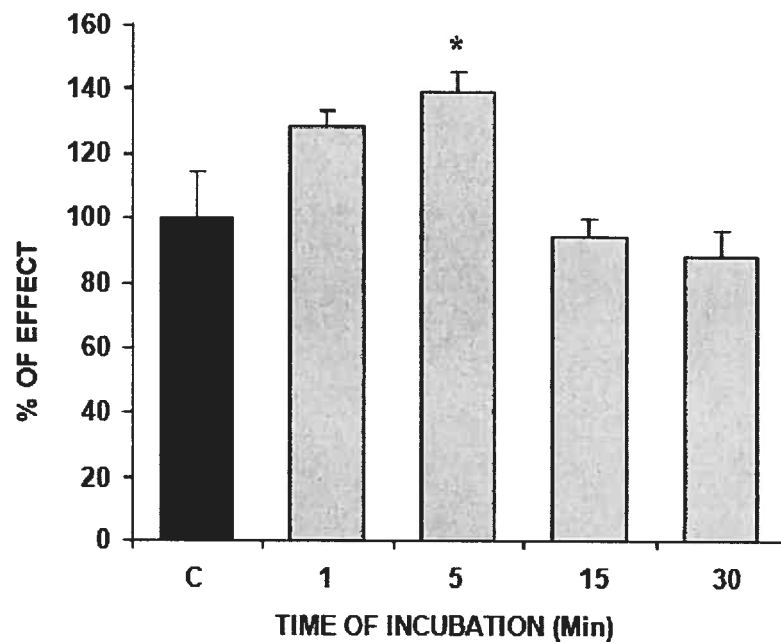


Figure 19 : Effet de la testostérone ( $10^{-10}$ M) sur le transport de 0,5 mM de calcium par les membranes lumineales distales. Variation avec le temps d'incubation.  $\text{Na}^+=0$ . Les données sont exprimées en pourcentages  $\pm$  la déviation standard. \*  $P<0,05$  comparé aux valeurs contrôles.  $n=5$ .

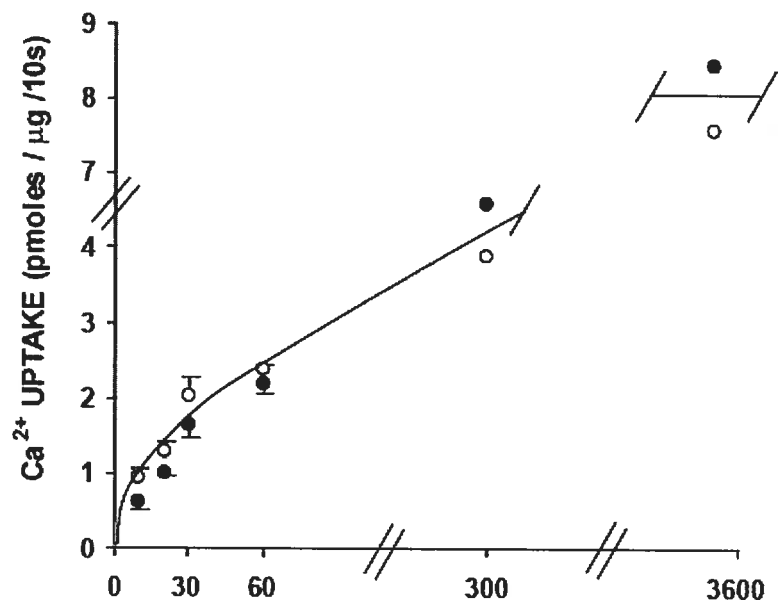


Figure 20 : Effet de la testostérone ( $10^{-10}$ M), appliquée directement sur les vésicules membranaires à 37°C, sur le transport de calcium (0,5 mM) par les membranes luminales du tubule distal.  $\text{Na}^+=0$  mM. Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  la déviation standard. (●) tubules contrôles; (○) tubules traités à la testostérone.  $n=3$ .



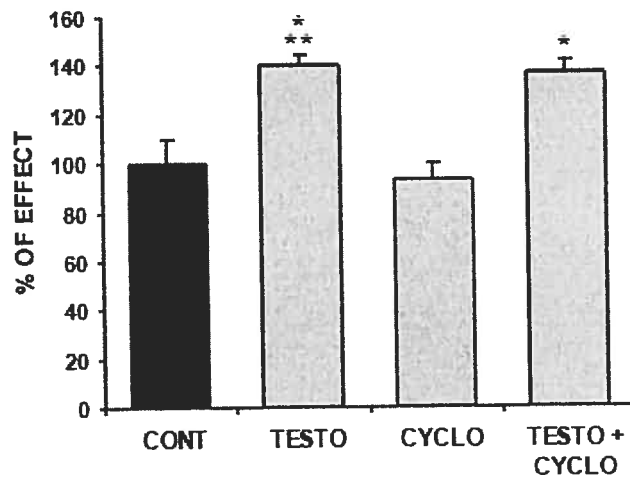


Figure 21 : Effet de la cycloheximide ( $10^{-6}$ M) sur le transport de calcium activé par la testostérone, à 37°C. Les données sont exprimées en pourcentages  $\pm$  la déviation standard. \*  $P < 0,05$ ; \* \* \*  $P < 0,01$  comparés aux valeurs contrôles.  $n=5$ .

#### *2.7.4 AR n'intervient pas dans la voie de signalisation étudiée*

L'inefficacité de la cycloheximide pour bloquer le transport de calcium en présence de testostérone suggère un mécanisme non génomique. Il est donc légitime, d'après la classification de Mannheim, de chercher à déterminer si le récepteur classique (cytoplasmique) aux androgènes participe au phénomène observé. Il existe plusieurs inhibiteurs spécifiques de l'activité de AR. Le premier que nous avons choisi est l'acétate de cyprotérone, anti-androgène stéroïdien, utilisé en clinique. Nous avons voulu en parallèle confirmer le résultat obtenu avec cette molécule avec un autre inhibiteur de AR, cette fois non stéroïdien : la flutamide. Les figures 22 et 23 montrent des résultats comparables. Aucun des deux inhibiteurs n'est en mesure d'empêcher l'augmentation du transport calcique par la testostérone.

Pour préciser ce résultat, nous avons voulu déterminer si le site de fixation de la testostérone pouvait se trouver sur la membrane plasmique des cellules tubulaires. Pour ce faire, nous avons incubé des tubules distaux avec des molécules de testostérone fusionnées avec de la BSA (bovine serum albumin). Cette protéine de grande taille empêche l'hormone d'entrer dans la cellule. Le couple testostérone-BSA stimule le transport de calcium de  $165,68 \pm 19,22\%$ , une valeur non significativement différente de celle de  $181,56 \pm 21,3\%$  induite par la testostérone seule (figure 24). Ce résultat semble donc indiquer que l'hormone n'a pas besoin d'entrer dans le cytoplasme pour agir et que son site de fixation se trouve bien au niveau de la membrane plasmique.

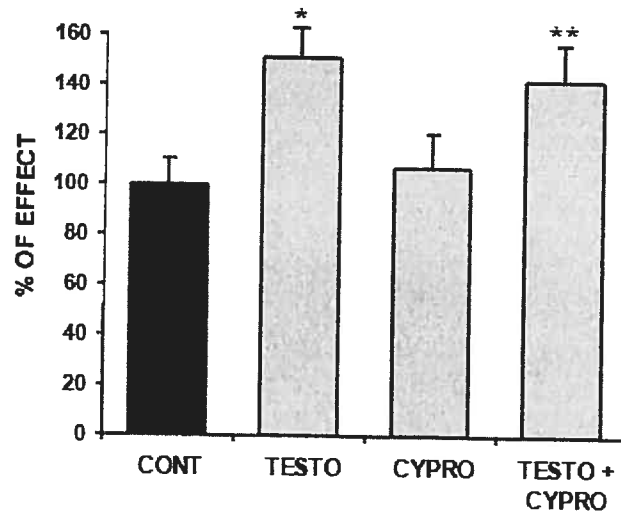


Figure 22 : Effet de l'acétate de cyprotérone ( $10^{-5}$ M) sur le transport de calcium activé par la testostérone, à 37°C. Les données sont exprimées en pourcentages  $\pm$  déviations standards. \*  $P < 0,05$ ; \* \*  $P < 0,02$  comparés aux valeurs contrôles.  $n=5$ .

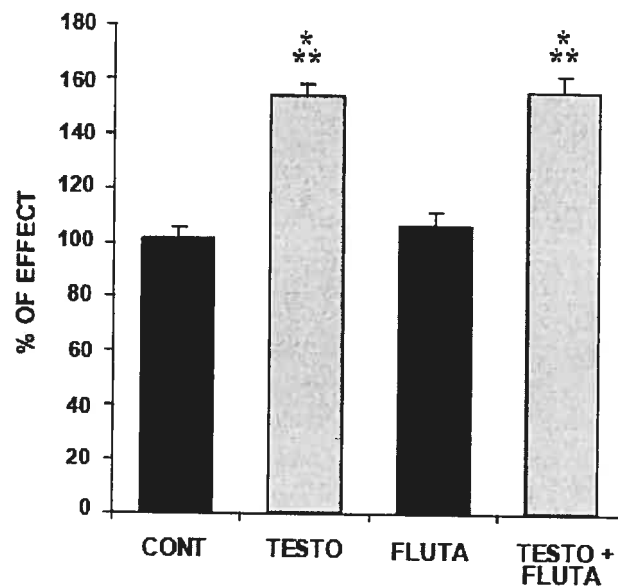


Figure 23 : Effet de la flutamide ( $10^{-6}$ M) sur le transport de calcium activé par la testostérone, à 37°C. Les données sont exprimées en pourcentages  $\pm$  déviations standards. \* \* \*  $P < 0,01$  comparés aux valeurs contrôles.  $n=4$ .

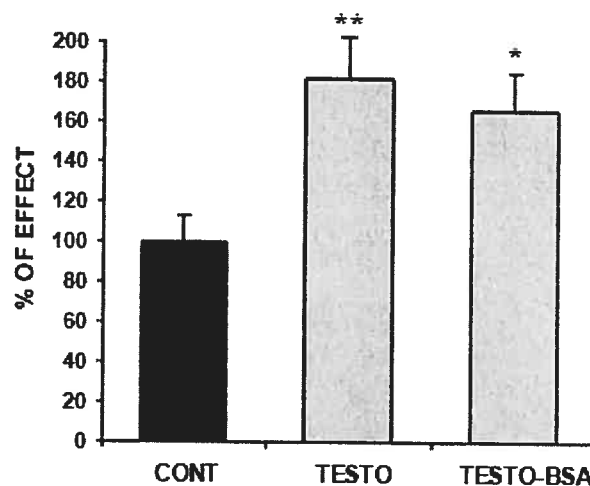


Figure 24 : Effet de la testostérone-BSA ( $10^{-10}$ M) sur le transport de calcium à 37°C. Les données sont exprimées en pourcentages  $\pm$  déviations standards. \*  $P < 0,05$ ; \* \*  $P < 0,02$  comparés aux valeurs contrôles.  $n=5$ .

## **2-8 La testostérone agit par un mécanisme mettant en œuvre la voie de signalisation dépendante des MAPK**

Nous nous sommes ensuite demandé quelle était la voie de signalisation activée dans notre modèle. Pour tenter de répondre à cette question, un certain nombre d'inhibiteurs spécifiques à des intermédiaires cytoplasmiques connus ont été ajoutés au milieu d'incubation des tubules distaux.

### ***2.8.1 Testostérone + Rp-AMPC et calphostin C***

Le Rp-AMPC est un analogue non hydrolysable de l'AMPC. De ce fait, si la kinase A, qui est activée par l'AMPC, fait partie des molécules indispensables à l'augmentation du transport de calcium par la testostérone, l'ajout de cet inhibiteur devrait stopper le phénomène. Les résultats de la figure 25 montrent que le Rp-AMPC n'a aucun effet.

Dans la même série d'expériences, nous avons aussi utilisé le calphostin C. C'est un inhibiteur de la protéine kinase C qui agit en interagissant avec le domaine de régulation de la protéine. Cette molécule entre donc en compétition avec les esters de phorbols et le diacylglycérol qui activent normalement la PKC. Lorsqu'elle est présente dans le milieu d'incubation, les résultats sont comparables avec ceux obtenus en présence de testostérone seule ou encore en présence de Rp-AMPC (figure 25). La PKC ne participe pas à l'ouverture des canaux calciques suite à la stimulation de la testostérone.

### ***2.8.2 Testostérone + genistein***

Nous avons alors choisi le genistein (figure 26). Il inhibe les molécules douées d'une activité tyrosine kinase, comme par exemple le récepteur pour l'EGF (epidermal growth factor) mais aussi les kinases intracellulaires de la famille SRC. On note cette fois que la valeur obtenue pour les échantillons ayant été stimulés par la

testostérone et en présence de genistein ( $61,25 \pm 6,88\%$  de la valeur contrôle) est significativement inférieure à celle obtenue pour la testostérone seule ( $115,83 \pm 2,31\%$  de la valeur contrôle). Il semble donc que lorsque la testostérone agit sur la réabsorption du calcium dans le segment distal du néphron, non seulement sans avoir à se fixer à son récepteur classique, mais en plus en déclenchant l'activation de molécules à activité tyrosine kinase qui ne font pas partie de la cascade activatrice généralement admise pour cette hormone.

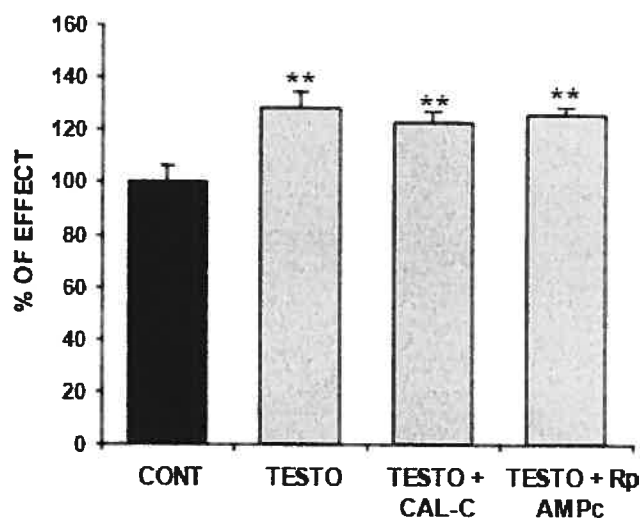


Figure 25 : Effet du calphostin C ( $10^{-4}\text{M}$ ) et du Rp-AMPc ( $10^{-4}\text{M}$ ) sur le transport de calcium activé par la testostérone, à  $37^{\circ}\text{C}$ . Les données sont exprimées en pourcentages  $\pm$  déviations standards. \* \*  $P < 0,02$  comparés aux valeurs contrôles.  $n=5$ .

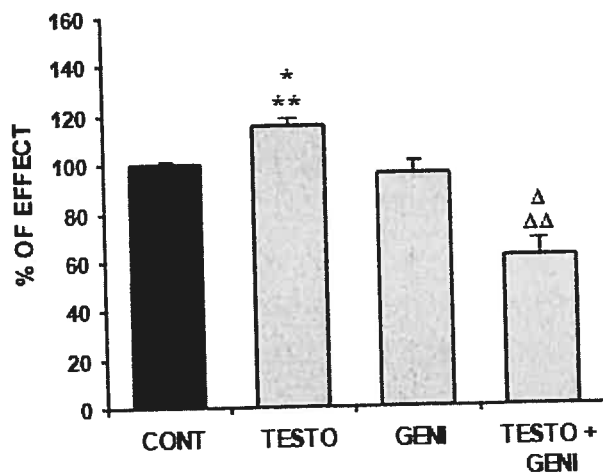


Figure 26 : Effet du genistein ( $10^{-6}$ M) sur le transport de calcium activé par la testostérone, à 37°C. Les données sont exprimées en pourcentages  $\pm$  la déviation standard. \* \* \*  $P < 0,01$  comparés aux valeurs contrôles.  $\Delta \Delta \Delta$   $P < 0,01$  comparés aux valeurs traitées à la testostérone.  $n=5$ .



### 2.8.3 Testostérone + PD98059

Après avoir identifié l'implication probable d'une activité tyrosine kinase dans notre modèle, il était nécessaire de vérifier si nous pouvions aussi mettre en évidence l'activation de sérine/thréonine kinases. Parmi celles-ci, la famille des MAPK (mitogen activated protein kinases) constitue un important système de signalisation cellulaire qui convertit un grand nombre de signaux extra cellulaires en réponses intra.cellulaires à travers des cascades de phosphorylations. Trois cascades parallèles ont à ce jour été identifiées dans les cellules de mammifères (Cano and Mahadevan 1995). Chacune constitue un module comportant trois kinases : une MAPK kinase kinase (MAPKKK) qui phosphoryle et active une MAPK kinase (MAPKK) qui à son tour active une MAPK par phosphorylation.

Le premier groupe est caractérisé par une activation Ras dépendante suite à la réception d'un signal extra cellulaire induit par la fixation d'un facteur de croissance (ERK : extracellular signal-regulated protein kinases) (figure 27).

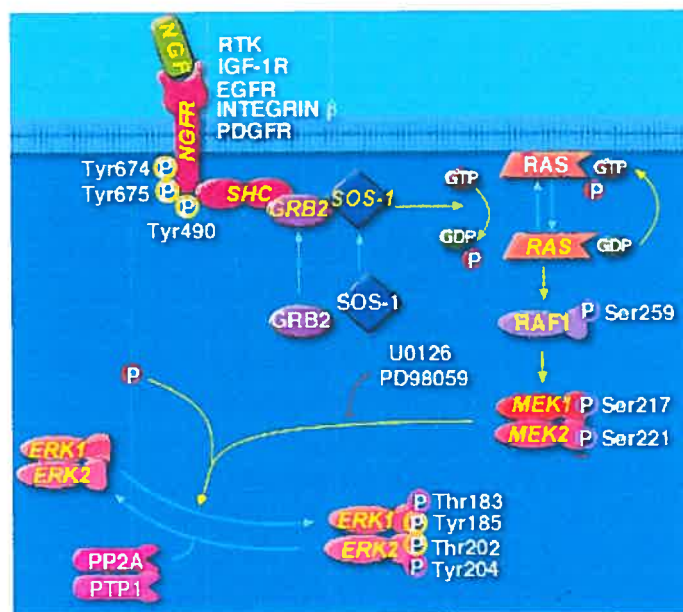


Figure 27 : Activation des MAPK de la famille ERK.

Dans ce système, le récepteur trans membranaire activé s'associe avec le domaine SH2 de la protéine adaptatrice Grb2 (Skolnik et al. 1993) et permet la

fixation du facteur SOS à la protéine G membranaire Ras. L'activation de Ras permet le recrutement de Raf-1 (MAPKKK) vers la membrane et son activation (Stokoe *et al.* 1994). Raf-1 peut alors phosphoryler et activer MEK (MAPKK) qui elle même active ERK (MAPK). ERK active ensuite certains gènes responsables de la survie cellulaire comme NF- $\kappa$ B ou bien c-jun.

Le PD98059 est un inhibiteur spécifique de MEK et est donc capable de bloquer toute la cascade précédemment décrite. Nous avons ajouté cette molécule au milieu d'incubation des tubules distaux. Les résultats sont présentés dans la figure 28. On note une différence significative entre le transport de calcium enregistré en présence de testostérone seule ( $152,58 \pm 15,55\%$  de la valeur contrôle) et celle mesurée en présence de l'hormone et du PD98059 ( $101,84 \pm 11,27\%$  de la valeur contrôle). MEK fait donc partie de la cascade signalétique étudiée.

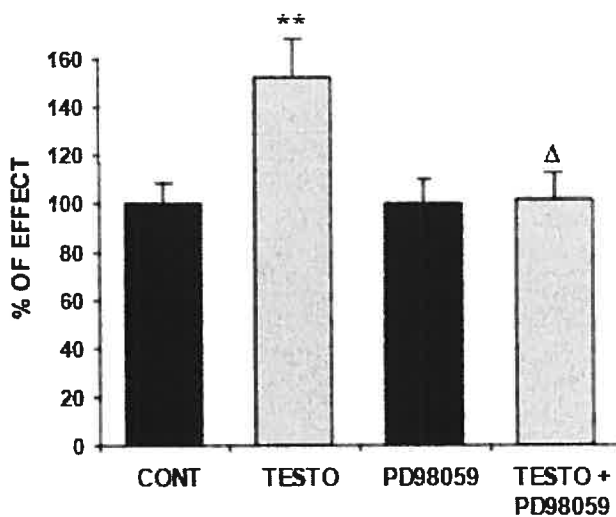


Figure 29 : Effet du PD98059 ( $10^{-6}$ M) sur le transport de calcium activé par la testostérone, à 37°C. Les données sont exprimées en pourcentages  $\pm$  la déviation standard. \* \*  $P < 0,02$  comparés aux valeurs contrôles.  $\Delta$   $P < 0,05$  comparés aux valeurs traitées à la testostérone.  $n=5$ .

### **3 Études réalisées sur les cellules MDCK en culture**

Il était ensuite nécessaire de confirmer dans un modèle cellulaire les résultats obtenus par la technique de transport membranaire. Nous avons donc mis en place une culture de cellules MDCK puisqu'elles forment une lignée originellement obtenue à partir de cellules du tubule distal du néphron de chien. Elles sont donc le plus proche possible de notre modèle initial.

#### **3.1 La testostérone provoque un influx de calcium dans les cellules MDCK en culture.**

Avant de chercher à préciser la nature des seconds messagers impliqués et de valider nos résultats précédents dans le modèle des cellules MDCK en culture, nous avons voulu vérifier que la testostérone pouvait provoquer aussi un influx de calcium dans ce type de cellule. La table 4 nous montre les résultats obtenus lors d'une expérience réalisée sur des cultures effectuées sur des inserts présentant des pores de 3  $\mu\text{m}$ . On note un accroissement de 161,25% de la quantité de calcium radiomarké dans les cellules MDCK entre le contrôle et l'échantillon traité par la testostérone ( $10^{-10}\text{M}$ ). Ce résultat est comparable à celui obtenu pour une concentration de  $10^{-11}\text{M}$  mais diminue fortement lorsque la dose de testostérone augmente ( $10^{-7}\text{M}$ ). Ce comportement apparaît en tout point semblable avec celui exposé dans la figure 12.

Testostérone (M)	$^{45}\text{Ca}^{2+}$ (% par rapport au contrôle)
C	100
$10^{-12}$	182,5
$10^{-11}$	263,75
$10^{-10}$	261,25
$10^{-7}$	153,75

Table 4 : Quantité de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  entrée dans les cellules MDCK sous l'influence de la testostérone. Les résultats sont exprimés en pourcentages par rapport au contrôle. n=1

### 3.2 Mise en évidence de la phosphorylation de ERK dans les cellules MDCK.

La figure 29 montre les résultats obtenus en western blot en utilisant un anticorps spécifique de ERK phosphorylé (p-ERK), le contrôle étant effectué en détectant ERK total. Deux bandes apparaissent à chaque fois. En effet, nos anticorps reconnaissent deux isoformes de ERK : ERK1 et ERK2. Un autre contrôle est effectué en répétant l'expérience en présence d'éthanol seul, puisque ce solvant véhicule la testostérone au contact des tubules. Nous observons une phosphorylation de ERK1 et ERK2 seulement lorsque la testostérone ou la testostérone couplée à la BSA sont présentes dans le milieu d'incubation des cellules MDCK. Nous confirmons ainsi les résultats obtenus pour notre premier modèle tubulaire et notamment le fait que la testostérone est capable d'agir sans entrer dans le cytoplasme des cellules.

Il était aussi nécessaire de démontrer dans ce nouveau modèle le fait que la testostérone agisse en très peu de temps. Nous avons donc essayé de détecter les variations de phosphorylation pour ERK, les cellules MDCK étant soumises à différents temps d'incubation en présence de testostérone ( $10^{-10}\text{M}$ ). Les résultats de la figure 30 nous permettent de conclure que le temps d'incubation qui permet

d'obtenir une phosphorylation optimale de ERK est de 5 min. Ce résultat est comparable avec celui observé sur la figure 19.

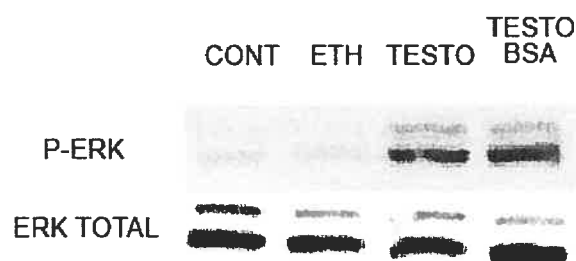


Figure 29 : Immunobuvardage Western effectué sur les cellules MDCK en culture. P-ERK (protéine ERK phosphorylé); CONT (contrôle); ETH (éthanol seul); TESTO (testostérone  $10^{-10}$ M); TESTO-BSA (testostérone couplée à la BSA,  $10^{-10}$ M). n=3.

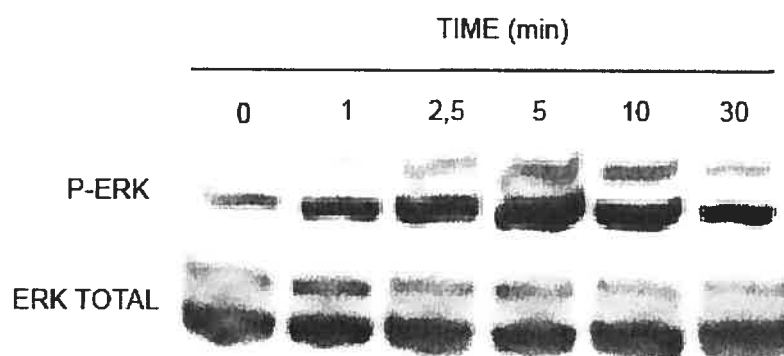


Figure 30 : Immunobuvardage Western effectué sur les cellules MDCK en culture. P-ERK (ERK phosphorylé) Mesure de la phosphorylation de ERK en fonction du temps. Les cellules sont incubées avec  $10^{-10}$ M testostérone pendant différentes durées. n=3.

La figure 31 représente une série d'expériences réalisées en présence de divers inhibiteurs. U0126 bloque spécifiquement MEK, AG99 inhibe le récepteur membranaire de l'EGF et l'acétate de cyprotérone empêche le fonctionnement du récepteur cytoplasmique à la testostérone. Nous observons que lorsque les deux premières molécules sont présentes dans le milieu, la testostérone ne peut plus induire la phosphorylation de ERK. MEK étant la MAPKK habituellement associée à ERK, il est logique de voir que son blocage empêche la phosphorylation de ERK. De plus, le fait qu'AG99 soit lui aussi efficace suggère l'implication du récepteur à l'EGF dans le mode d'action de la testostérone.

La détection de la phosphorylation de ERK dans les cellules MDCK a aussi été faite par cytofluorométrie. La figure 32 représente les résultats obtenus pour 5 min d'incubation à la testostérone ( $10^{-10}$ M). On note clairement un déplacement vers la droite des cellules entre les figures 32A et 32B. La fluorescence du FITC associé à l'anticorps anti P-ERK utilisé est lue sur le canal FL1 de l'appareil. La figure 32C est une autre représentation de ce déplacement dû à une augmentation de la fluorescence. La testostérone provoque donc bien une activation de ERK par phosphorylation.

### **3.3 Mise en évidence de la phosphorylation de MEK dans les cellules MDCK.**

Un anticorps primaire anti P-MEK a ensuite été utilisé pour visualiser la phosphorylation de MEK, MAPKK généralement associée à ERK. Les résultats sont présentés dans la figure 33. On note qu'un grand nombre de cellules (92%) sont devenues fluorescentes, suggérant une forte activation de MEK suite à la stimulation par la testostérone. Cette donnée confirme le fait que les androgènes activent une signalisation cellulaire dépendante des MAPK pour ouvrir les canaux calciques présents dans la membrane apicale des cellules distales.



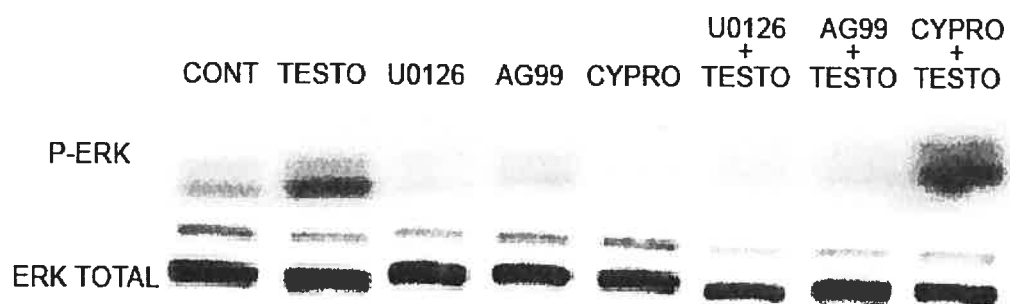


Figure 31 : Immunobuvardage Western effectué sur les cellules MDCK en culture. P-ERK (ERK phosphorylé). Les cellules sont incubées avec  $10^{-10}$ M testostérone.  $10^{-5}$ M U0126,  $10^{-5}$ M AG99 et  $10^{-6}$ M acétate de cyprotérone. n=2.

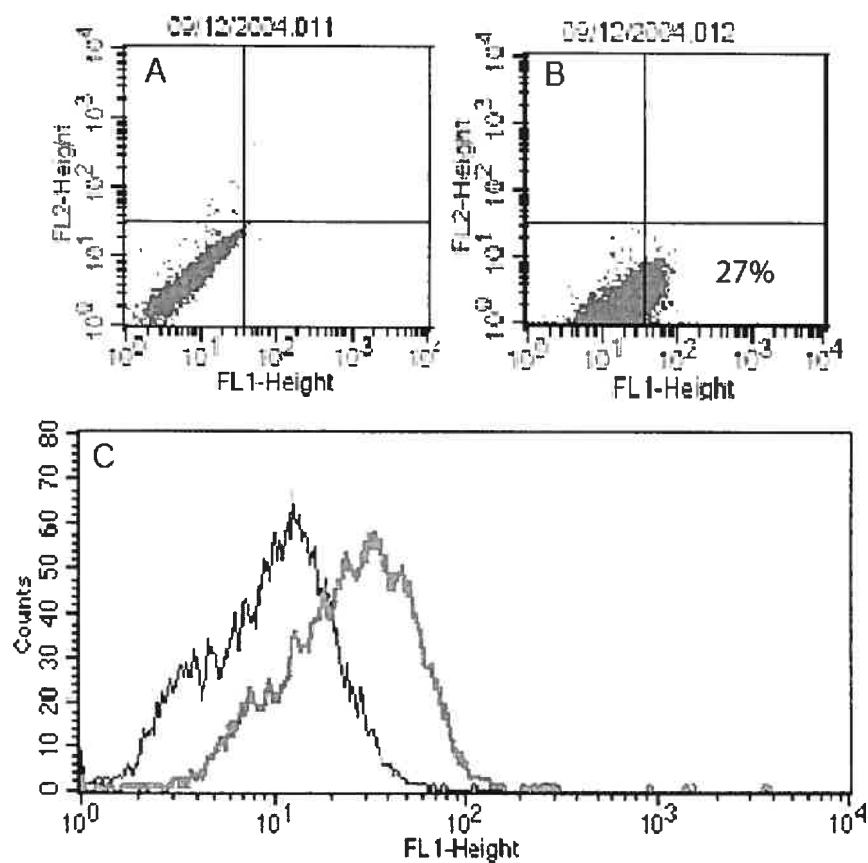


Figure 32 : Mise en évidence de la phosphorylation de ERK par FACS. L'anticorps secondaire est couplé au FITC détecté sur le canal FL1. A, contrôle (éthanol seul); B cellules traitées (éthanol et testostérone  $10^{-10}$ M); C, histogrammes de fluorescence mesurés dans les cellules traitées avec (ligne noire) ou sans (ligne grise) testostérone  $10^{-10}$ M.

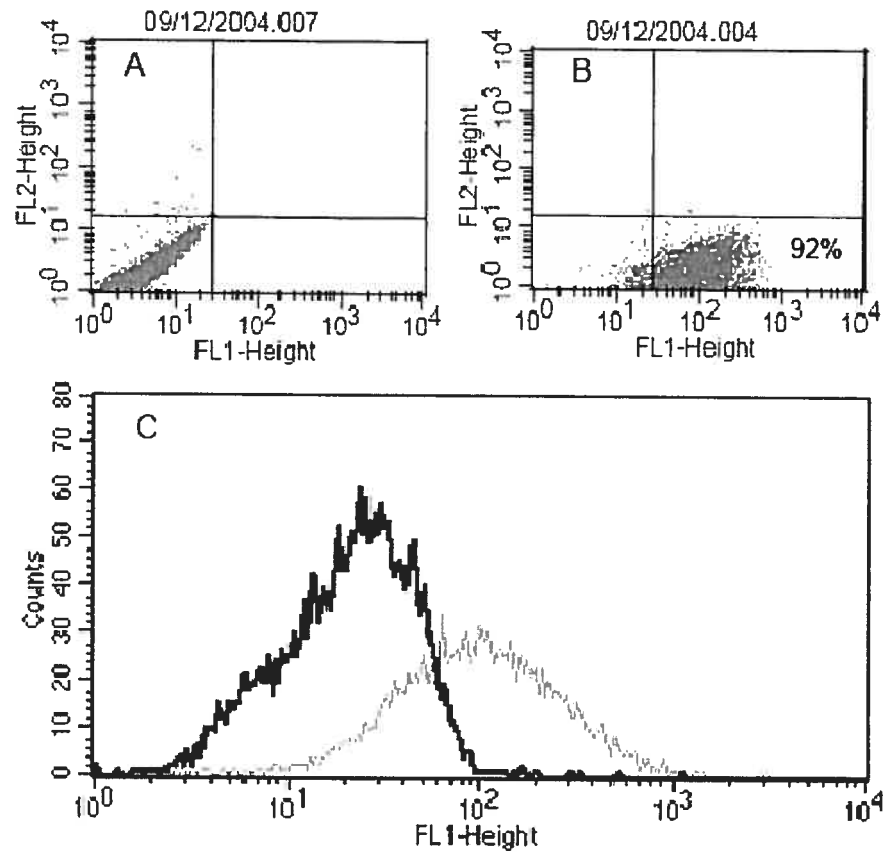


Figure 33 : Mise en évidence de la phosphorylation de MEK par FACS. L'anticorps secondaire est couplé au FITC détecté sur le canal FL1. A, contrôle (éthanol seul); B cellules traitées (éthanol et testostérone  $10^{-10}$ M); C, histogrammes de fluorescence mesurés dans les cellules traitées avec (ligne grise) ou sans (ligne noire) testostérone  $10^{-10}$ M.

# Discussion

## 1 Pureté des préparations membranaires

Il est important d'évaluer la pureté des préparations utilisées dans nos expériences car il existe une grande différence de comportement des membranes cellulaires vis-à-vis du transport de calcium selon que l'on se place dans le tubule proximal ou distal, ou encore que l'on veuille étudier les flux calciques au pôle apical ou basal des cellules.

En premier lieu, l'examen microscopique des tubules proximaux et distaux purifiés à l'aide du gradient de percoll 40% nous permet déjà d'évaluer la réussite de cette purification. On observe habituellement très peu de contamination dans les tubules proximaux, tandis que les tubules distaux sont légèrement contaminés par des glomérules et de courts fragments de tubules proximaux. La précipitation au  $MgCl_2$  précédemment décrite permet, outre la purification des membranes luminales, de diminuer fortement cette contamination.

En second lieu, les activités en phosphatase alcaline, un marqueur enzymatique de la membrane luminale du tubule proximal, et en  $Na^+/K^+$  ATPase, un marqueur enzymatique des membranes basolatérales, mesurées dans les membranes préparées à partir des tubules, nous permettent de quantifier et d'évaluer la pureté des membranes luminales utilisées pour les études de transport de  $Ca^{2+}$ . Les activités en phosphatase alcaline élevées (X 10,3 par rapport au cortex rénal total) et en  $Na/K$  ATPase faibles (X 0,53 par rapport au cortex total) mesurées dans nos préparations de membranes luminales proximales nous montrent qu'elles sont fortement enrichies en membranes apicales issues des cellules tubulaires proximales et appauvries en membranes basolatérales. Concernant nos membranes luminales distales, l'enrichissement en phosphatase alcaline mesuré (X 2,02) indique une légère contamination par des membranes proximales dont il faudra tenir compte lors

de l'interprétation des résultats. Enfin, les valeurs obtenues pour la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase ( $\times 0,01$ ) nous confirment que notre protocole a été efficace et nous a permis d'éliminer pratiquement toutes les membranes basolatérales.

En troisième lieu, même si nous relevons une légère contamination par des membranes lumenales issues du tubule proximal dans nos préparations de tubules distaux, il faut souligner le fait que nous obtenons des résultats caractérisés par une double cinétique. Cette caractéristique n'a été localisée qu'au niveau des membranes lumenales distales dans les études antérieures réalisées au laboratoire (*Brunette et al.* 1992a). Enfin, nous observons aussi un rôle inhibiteur du sodium dans nos résultats. Ceci est encore une fois un élément qui n'a été associé qu'aux membranes distales (*Brunette et al.* 1992b).

## **2 La testostérone influence-t-elle la réabsorption du calcium par les cellules du tubule contourné proximal?**

De nombreuses études ont montré la présence du récepteur aux androgènes dans les cellules du tubule contourné proximal. Ainsi, la testostérone est susceptible de stimuler l'activité de la 25-hydroxy  $\text{D}_3$   $1\alpha$ -hydroxylase dans le tubule proximal de poulet (*Tanaka et al.* 1978). Il a aussi été rapporté que les androgènes activaient la production d'angiotensinogène accompagnée d'une augmentation de nombre d'ARNm codant pour cette protéine (*Ellison et al.* 1989). Cet effet positif sur la transcription d'un gène est caractéristique du mode d'action génomique de l'hormone qui dépend essentiellement de la présence d'un récepteur cytoplasmique dans le type de cellule étudiée. Nos résultats suggèrent que la testostérone n'a pas d'effet sur le transport de calcium dans ce segment. La figure 7 ne montre aucune différence entre les tubules incubés en présence de testostérone à  $10^{-10}\text{M}$  et le contrôle. De plus, toute une gamme de concentrations a été testée de façon à confirmer ce résultat (figure 8), même pour des valeurs supraphysiologiques.

On peut donc supposer que malgré la présence du récepteur, d'autres éléments nécessaires à la prise en charge du calcium lors de son transport

transcellulaire ne sont pas présents dans les cellules tubulaires proximales. Le transport de  $\text{Ca}^{2+}$  proximal est donc probablement de nature paracellulaire. Ainsi, les calbindines  $\text{D}_{28\text{k}}$  et  $\text{D}_{9\text{k}}$  n'y ont pas été détectées (*Christakos et al.* 1981). De même, on ne peut pas non plus exclure le fait que les canaux calciques dont le fonctionnement est modulé par les androgènes soient absents de la membrane apicale de ces cellules. L'équipe de Bindels, qui a particulièrement étudié la famille des canaux ECAC, a ainsi démontré que TRPV5 et TRPV6 étaient majoritairement concentrés dans le tubule distal (*Loffing et al.* 2001a). Il se peut aussi que certains messagers intracellulaires nécessaires à la transduction du signal délivré par l'hormone ne soient pas disponibles dans les cellules proximales.

### **3 La testostérone augmente la réabsorption du calcium par les cellules du tubule contourné distal.**

Dès 1983, l'équipe de Lu (*Goldstone et al.* 1983) a suggéré que la testostérone provoquait un influx de calcium dans le cortex rénal. Le vérapamil était capable de bloquer cette réponse qui était accompagnée d'une augmentation de l'endocytose des cellules tubulaires et d'une stimulation de la réabsorption des hexoses et des acides aminés. L'augmentation de la concentration de testostérone *in vivo* est aussi susceptible de provoquer une accumulation de calcium dans le cortex rénal (*Schreiber and Schwille* 1995). En 1996, *Koh et al.* (1996) ont montré que la testostérone provoquait une hypocalcémie et une hypocalciurie chez des rats males orchiectomisés et chez des rats femelles ovariectomisés. Mais encore une fois, comme dans les études précédentes, les protocoles expérimentaux n'ont pas permis de préciser quel était le segment du néphron impliqué dans ces modifications de la balance calcique. De ce fait, l'étude que nous avons menée *in vitro* apporte de nouveaux éléments. La figure 9 montre le résultat d'une incubation de 5 min des tubules distaux en présence de testostérone. L'hormone augmente significativement le transport de calcium par les membranes luminales issues de ce segment, et ce, indépendamment de tout autre facteur systémique. Le fait d'ajouter du sodium dans

le milieu produit une baisse en valeur absolue de la quantité d'ions transportée par les membranes lumineuses mais l'effet de l'hormone reste significatif par rapport au contrôle (figure 10). Cette donnée n'est pas incompatible avec les conditions régnantes *in vivo* dans le néphron. En effet, le sodium est massivement réabsorbé dans le tubule proximal, dans la branche ascendante de l'anse de Henlé ainsi que dans le tubule distal. Sa concentration va donc en diminuant le long du néphron jusqu'à atteindre une valeur d'environ 40 mmol/L (Schnermann *et al.* 1982). Cette influence négative du sodium sur le transport calcique est caractéristique puisqu'elle a déjà été mise en évidence pour d'autres hormones comme l'aldostérone par exemple (Leclerc *et al.* 2004).

### **3.1 La testostérone agit à une concentration physiologique**

Nous avons ensuite voulu déterminer quelle était la concentration optimale de testostérone pour obtenir un effet maximal. Une courbe dose réponse est présentée sur la figure 11. Elle nous montre que les effets maximaux de la testostérone obtenus dans notre système sont détectés lorsqu'elle est présente dans le milieu d'incubation à une concentration de  $10^{-10}$ M. Que représente cette valeur *in vivo* ? Tout d'abord, il faut insister sur le fait que l'évaluation du degré d'androgénisation d'un sujet n'est pas chose aisée. Ainsi, on peut doser soit les androgènes et donc principalement la testostérone ou un marqueur de l'effet biologique des androgènes dans l'organisme. La LH représente un tel marqueur à condition toutefois d'avoir un système hypothalamo-hypophysaire fonctionnel. Or nous avons vu que la fonction gonadotrope est altérée, de manière relative, avec l'avancée en âge. Il en résulte que le dosage de LH n'est pas un index valide pour le diagnostic du déficit androgénique partiel du sujet âgé. Certes, une élévation de la LH indique une carence androgénique, mais l'absence d'élévation de la LH ne permet pas d'éliminer une telle carence.

Nous avons vu que la SHBG augmente de manière significative avec l'âge. Ainsi une plus grande proportion de la testostérone circulante est liée à la SHBG, ce

qui restreint sa diffusion vers les tissus cibles. La fraction biodisponible pour les tissus cibles est ainsi réduite. Il a ainsi été constaté par de nombreux auteurs que, du fait de l'élévation de la SHBG chez le sujet âgé, la testostérone libre (*Deslypere and Vermeulen* 1984), et la testostérone biodisponible (*Dechaud et al.* 1989) diminuent de manière plus marquée avec l'âge que ne le fait la testostérone totale.

En plus de l'augmentation de la SHBG, on sait que d'autres facteurs de variations de la SHBG sont fréquemment rencontrés chez les patients âgés, en particulier sa diminution chez l'obèse et/ou en cas d'insulinorésistance (*Pugeat et al.* 1991), et ses variations en rapport avec la prise de certains médicaments (*Pugeat et al.* 1981). Il apparaît donc particulièrement nécessaire d'utiliser, chez le sujet âgé, une méthode de dosage dont le résultat n'est pas influencé par les modifications de la concentration de SHBG. Il peut s'agir de la mesure de la concentration de la testostérone libre ou de la testostérone biodisponible ou encore de méthodes calculant la concentration de testostérone libre ou biodisponible en utilisant l'équation de la loi d'action de masse à partir de la mesure de la testostérone totale et de la SHBG (*Vermeulen et al.* 1999). Mais quelle que soit la méthode utilisée, la valeur obtenue doit être comparée à une valeur seuil, statistiquement calculée à partir d'une population d'hommes jeunes en bonne santé. La limite inférieure de la normale des hommes jeunes est en particulier le seuil utilisé pour inclure les sujets dans les études cliniques visant à estimer l'effet du traitement androgénique substitutif chez les sujets âgés. Cette valeur s'établit à environ  $10^{-10}$ ,  $10^{-11}$ M selon les études et les auteurs. Mais ceci revient à considérer que le critère pour évaluer l'androgénisation est le même chez les hommes jeunes et chez les hommes âgés.

La valeur obtenue dans notre modèle est donc comparable à la valeur seuil normalisée chez l'homme. Ce n'est donc pas une concentration supraphysiologique qui est responsable de l'effet observé, mais bien les propriétés intrinsèques de ce stéroïde en présence des tubules rénaux. De plus, lorsque nous faisons évoluer la dose d'hormone vers des valeurs supérieures, la courbe redescend pour donner un profil général en cloche. Il y a donc une inhibition. Ce phénomène a déjà été montré pour la progestérone dans la lignée cellulaire SKOV-3 (cancer ovarien) (*McDonnel*



and Murdoch 2001). Dans ce modèle, les auteurs ont étudié les effets de fortes doses de progestérone sur la sécrétion de l'urokinase. Les résultats ont prouvé l'existence de l'intégration de cette hormone dans la bicouche lipidique membranaire qui avait pour conséquence de faire baisser la sécrétion d'urokinase sous l'action non génomique de la progestérone. Cet effet ne s'observe pas avec les autres stéroïdes tels que la testostérone ou l'oestradiol. Il y a donc bien une spécificité alors que des inhibiteurs comme le RU486 n'ont aucune action apparente. Il pourrait donc s'agir d'une hypothèse envisageable dans notre modèle : la testostérone, à dose supraphysiologique, vient s'insérer dans la membrane apicale des cellules tubulaire en perturbant le fonctionnement des canaux calciques considérés.

### **3.2 La testostérone active des canaux de basse affinité au calcium.**

Nous avons voulu ensuite définir les paramètres cinétiques caractéristiques de ce transport de calcium. Nous avons donc fait varier la concentration de calcium présent dans le milieu d'incubation des vésicules membranaires. A l'aide de ces résultats, une courbe a pu être tracée selon la représentation d'Eadie-Hofstee qui permet de visualiser les différentes composantes d'un flux calcique lorsqu'elles sont présentes. En l'occurrence, la figure 12 présente deux zones bien distinctes. Pour chaque échantillon (contrôle ou traité à  $10^{-10}$ M testostérone), nous avons pu tracer deux droites de régression, qui représentent au moins deux types de canaux différents. En effet, chacune de ces droites peut être caractérisée par sa pente (le  $K_m$ ) et par son intersection avec l'axe des ordonnées (le  $V_{max}$ ). Aussi bien pour le contrôle que pour les échantillons traités, la première droite se situe dans la zone de faibles concentrations en substrat de la courbe, et la seconde dans la zone de fortes concentrations. Nous avons donc pu définir à chaque fois une composante à forte affinité au calcium et une composante de faible affinité.

Les analyses statistiques de la table 2 nous permettent de conclure que la testostérone modifie le  $K_m$  de la composante à faible affinité du transport calcique. Les membranes lumineales du tubule contourné distal contiennent donc plusieurs

types de canaux calciques. Les études précédentes effectuées au laboratoire ont aussi montré ce type de profil. Par exemple, l'aldostérone augmente le  $V_{max}$  des deux composantes (Leclerc *et al.* 2004) alors que les oestrogènes diminuent le  $V_{max}$  des canaux de forte affinité (Brunette and Leclerc 2001). D'autres études utilisant des techniques électrophysiologiques (Peng *et al.* 2000) ou de biologie moléculaire (Barry *et al.* 1998a) ont aussi mis en évidence l'hétérogénéité des canaux calciques dans les membranes apicales des tubules distaux. Le fait que la testostérone agisse sur le  $V_{max}$  indique que l'hormone n'augmente pas l'affinité du canal pour le calcium mais permet surtout une hausse de l'affichage des canaux à la surface de la membrane. Dans d'autres modèles, les androgènes ont déjà fait la preuve de leur capacité à modifier le fonctionnement de canaux calciques. Par exemple, la testostérone peut induire un flux calcique rapide dans les ostéoblastes qui peut être bloqué avec l'ajout de vérapamil, un inhibiteur spécifique des canaux de type L (Armen and Gay 2000). Dans les lymphocytes T, à l'aide d'une technique mettant en œuvre le Fura-2, l'équipe de Wunderlich a pu prouver que le calcium détecté dans le cytoplasme après une stimulation aux androgènes provenait exclusivement du milieu extracellulaire en passant par des canaux calciques bloquables au  $Ni^{2+}$  (Benten *et al.* 1997). Enfin, les cellules musculaires semblent être elles aussi sous l'influence des androgènes concernant leur métabolisme calcique : (Deenadayalu *et al.* 2001) ont démontré que la testostérone ou la DHT relaxait les cellules musculaires artérielles chez le porc en activant indirectement un canal potassique calcium dépendant. Nous avons donc nous aussi décidé de déterminer quelle était la nature des canaux calciques activés par la testostérone dans notre modèle.

### **3.3 Le transport de calcium induit par la testostérone se fait par l'intermédiaire des canaux de type T**

Grâce à une série d'expériences mettant en jeu des inhibiteurs pharmacologiques (figure 13, 14 et 15) nous avons pu bloquer l'influx de calcium dans les vésicules en présence de mibéfradil, bloqueur spécifique des canaux

calciques de type T. Or, les travaux de l'équipe d'Andreasen (*Andreasen et al.* 2000) utilisent des techniques de RT-PCR qui ont permis de mettre en évidence la synthèse des sous-unités  $\alpha 1G$  (CA<sub>v</sub>3.1) des canaux calciques de type T dans le DCT, le CNT et dans le tubule collecteur. Ces protéines ont été ensuite localisées grâce à des anticorps dirigés contre les 22 premiers acides aminés de  $\alpha 1G$ . Les cellules tubulaires étaient particulièrement positives au niveau de leurs pôles apicaux. Les études électrophysiologiques menées par l'équipe de Perez-Reyes sur les canaux T ont mis en évidence une faible conductance élémentaire de 7 pS (*Perez-Reyes et al.* 1998). Cette caractéristique est à mettre en parallèle avec notre définition de canal à basse affinité. Une faible conductance pourrait sans nul doute se traduire par la nécessité, pour que le canal fonctionne, d'avoir une relativement forte concentration en calcium dans son environnement. De plus, les canaux de type T ont une structure comprenant une sous-unité  $\alpha 1$  responsable des caractéristiques basiques du canal (diamètre du pore et détecteur de voltage) et des sous-unités accessoires ( $\alpha/\delta$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) permettant de moduler les propriétés du canal (amplitude des courants, cinétiques d'activation/inactivation, sensibilité aux inhibiteurs).  $\beta$  en particulier possède des sites de phosphorylation qui lui permettent d'agir sur le trafic des canaux vers la membrane. Ainsi, *Viard et al.* (2004) ont démontré que la phosphorylation de ser574 de la sous-unité  $\beta$  par la PI3 kinase était nécessaire et suffisante pour diriger le canal vers la membrane plasmique dans les cellules COS-7 et les neurones. Il est donc probable que cette sous-unité puisse être soumise à une régulation hormonale dans la mesure où l'hormone considérée puisse déclencher une cascade de phosphorylations aboutissant à la sous-unité  $\beta$ . Dans ces conditions, le nombre de canaux affichés sur la membrane plasmique augmenterait de la même façon que nous l'avons démontré à partir des données de la figure 12 et de la table 2.

Le canal de type T est donc un candidat pour le transport de calcium dans le néphron distal. Ce sont pourtant les canaux de la famille ECAC qui sont le mieux caractérisés dans ce segment du néphron, et particulièrement ECAC1. Les études sur la régulation des canaux ECAC ont surtout porté sur l'influence des hormones. (*Dardenne et al.* 2001) ont généré une souris knock-out pour le gène de la 25-

hydroxyvitamine D3-1 $\alpha$  hydroxylase, une enzyme rénale qui contrôle la sécrétion de 1,25(OH) $_2$ D $_3$ , régule l'expression du VDR et est localisée dans le tubule proximal (*Brunette et al.* 1978). Ces souris souffrent d'hypocalcémie et d'hyperparathyroïdie secondaire. Dans ce modèle, le niveau d'expression de ECAC1 est proportionnel à la quantité de calcium dans le sang. Si la calcémie est rétablie par supplémentation en 1,25(OH) $_2$ D $_3$ , on note une augmentation de l'expression de ECAC1 et des autres transporteurs calciques associés (calbindine D $_{9k}$ , D $_{28k}$ , échangeur Ca $^{2+}$ /Na $^{+}$ , et Ca $^{2+}$  ATPase). Le même type d'observation a été faite sur des souris knock-out pour le gène codant le VDR (*Van Cromphaut et al.* 2001). Ces souris présentent une calciurie très importante et l'expression des gènes codant pour ECAC1 et 2 est diminuée.

Dans les études précédentes, il est cependant difficile de déterminer si les canaux ECAC sont directement régulés par la 1,25(OH) $_2$ D $_3$  ou bien par le taux de calcium sanguin. Les auteurs ont donc supplémenté les souris knock-out avec du calcium pour démontrer que l'augmentation de la calcémie pouvait stimuler la transcription de ECAC indépendamment de la vitamine D. D'un autre côté, les promoteurs des gènes TRPV5 et 6 comportent des séquences sensibles à la vitamine D. La régulation de l'expression de ces canaux apparaît donc comme étant complexe et multifactorielle.

L'action des œstrogènes a aussi été étudiée par rapport à la régulation du fonctionnement d'ECAC. Ses récepteurs ont pu être localisés à la fois dans les tubules proximaux et distaux (*Hagenfeldt and Eriksson* 1988). L'étude du promoteur du gène de ECAC2 a permis de mettre en évidence la présence d'une séquence potentiellement activable par les œstrogènes dans la région 5' (*Weber et al.* 2001). La séquence d'activation précise n'est cependant pas encore bien comprise et nécessite notamment des précisions sur l'efficacité des œstrogènes sur l'activité des promoteurs impliqués. Pourtant, notre laboratoire a pu démontrer que les œstrogènes diminuent la réabsorption de calcium par les tubules distaux mais sont sans effets au niveau des tubules proximaux (*Brunette and Leclerc* 2001). L'hormone est active après un court temps d'incubation et agit sur la

composante de haute affinité du transport. mais le mécanisme d'action précis des oestrogènes n'est pas encore bien défini et nécessiterait d'être plus amplement étudié.

Il semble donc que l'épithélium du néphron distal comporte au moins trois types de canaux : le type T, le type L, et ECAC1. Notre laboratoire a d'ailleurs pu mettre en évidence la présence de canaux de type L, P/Q et T (*Brunette et al.* 2004). La régulation hormonale, et en particulier par les androgènes, d'un tel ensemble est nécessairement complexe. Même si la testostérone agit rapidement sur les canaux de type T, il n'est pas non plus exclu qu'elle puisse fonctionner selon une autre signalétique sur les canaux ECAC à plus long terme.

#### **4 La DHEA et la DHT sont deux des androgènes les plus actifs in vivo : ont-ils un effet sur la réabsorption du calcium ?**

La figure 16 nous montre une courbe dose-réponse pour la DHEA dans notre système. On note un effet comparable à celui de la testostérone (figure 11) avec une concentration optimale de  $10^{-9}$ M. Cette molécule fait partie des précurseurs importants de la testostérone lors de sa synthèse dans les cellules de Leydig testiculaires. Cependant, elle est détectable en grande quantité dans le plasma. En effet, La DHEA est le plus abondant des stéroïdes produits par les glandes surrénales. Malgré sa forte concentration plasmatique, son rôle dans l'organisme est peu clair. Une des raisons expliquant le peu d'études la concernant est le fait que la DHEA n'est pas synthétisée par les animaux de laboratoire. Elle est propre aux primates. De surcroît, il semble que la DHEA n'ait pas d'activité intrinsèque bien démontrée puisqu'elle ne serait qu'un précurseur d'autres stéroïdes actifs androgéniques et œstrogéniques, produits dans les tissus cibles périphériques (*Labrie et al.* 1997). La connaissance insuffisante de la DHEA surprend d'autant plus que sa concentration plasmatique est 20 fois plus élevée que celle des autres stéroïdes circulants, le taux de S-DHEA (le dérivé sulfaté de la DHEA) étant 300 à

500 fois plus élevé que celui de la DHEA. Elle est sécrétée dans la zone réticulée de la corticosurrénale et est rattachée à la famille des androgènes surrénaliens

Les actions de cette DHEA 'surrénalienne' sont bien énigmatiques dans la mesure où cette molécule défie les lois de l'endocrinologie classique. Stéroïde inactif puisque sans récepteur mais sécrété en grande quantité, la DHEA est un précurseur des stéroïdes sexuels exerçant leur action dans la cellule même où ils ont été synthétisés, et ce indépendamment du niveau de fonctionnement des glandes endocrines affectées à la production des androgènes et des estrogènes. La DHEA produit *in situ* l'un et l'autre sous la forme de testostérone et de DHT, de 17 bêta estradiol et d'estrone. Selon leur contenu enzymatique, les tissus cibles périphériques sont à même de contrôler la formation et de moduler l'action des stéroïdes sexuels sur la base d'une activité intracrine (Labrie et al. 1997). Il en résulte une meilleure adaptation aux besoins locaux, une économie des stéroïdes sexuels circulants sans effet de dilution dans le secteur extracellulaire et la possibilité de disposer de métabolites ayant des actions intéressantes. La DHEA permet aussi de pallier localement un déficit en stéroïdes sexuels.

Sur ces bases, nous pouvons donc envisager que la DHEA puisse se transformer en testostérone lors de l'incubation des tubules en présence de l'hormone. Pourtant, le fait que le temps optimal détecté pour obtenir un effet maximal soit aussi court que 5 min (comme nous le verrons en analysant la figure 18) ne plaide pas en la faveur de cette hypothèse. En effet, on peut imaginer qu'un délai raisonnable soit nécessaire pour opérer les transformations chimiques nécessaires pour métaboliser la DHEA en testostérone. Et si nous partons de ce postulat, sachant que la DHEA ne peut pas se fixer ni agir par l'intermédiaire de AR, il faut envisager la possibilité que la DHEA, comme la testostérone, agisse par l'intermédiaire d'une autre voie métabolique que celle impliquant le récepteur 'classique' aux androgènes, AR.

La figure 17 représente les résultats obtenus pour la DHT. On n'observe aucun effet de ce stéroïde sur le transport de calcium par les membranes lumineales

distales. Nous avons exposé au paragraphe 1.1.6 de l'introduction le fait que la DHT est un métabolite actif de la testostérone dans les cellules possédant l'enzyme 5 $\alpha$  réductase. Or, l'équipe de Shimizu a montré en 1998 que cette enzyme était présente dans les tubules collecteurs chez le rat (*Matsuzaki et al.* 1998). Un peu plus tard, en 2003, (*Quinkler et al.* 2003) ont détecté la 5 $\alpha$  réductase aussi bien dans les fractions médullaires que corticales du rein. Bien qu'il n'existe pas de données spécifiques sur la présence de cette enzyme dans les cellules tubulaires distales, nous pouvons supposer à la lecture de ces éléments que tel est bien le cas. Or, dans les tissus où les effets de la DHT et de la testostérone ont été comparés, on observe en général des actions similaires pour les deux hormones. Ainsi, la testostérone et la DHT diminuent le transport des ions Cl<sup>-</sup> dans les cellules épithéliales de l'intestin de rat (*Leung et al.* 2001). De même, la DHT peut agir sur la concentration du calcium intracellulaire puisque *Deenadayalu et al.* (2001) ont montré que les deux androgènes pouvaient relaxer les cellules musculaires artérielles. Tous ces tissus comportent à la fois le récepteur classique aux androgènes et la 5  $\alpha$  réductase, molécules dont sont dotées également les cellules tubulaires distales. Dans ces conditions, nous pouvons supposer que l'absence d'effet de la DHT dans notre système reflète là aussi la présence d'un autre mode d'action des hormones que celui mettant en œuvre le récepteur aux androgènes.

Ces données, obtenues dans la première partie de notre étude, nous ont conduit à orienter notre projet de façon à éclaircir le mode d'action de la testostérone dans le système étudié, lequel ne semble manifestement pas cadrer avec le mode d'action génomique de l'hormone impliquant nécessairement le récepteur aux androgènes AR.

## **5 La testostérone influence-t-elle le transport de calcium par un mécanisme d'action non génomique ?**

### **5.1 La testostérone agit sur les tubules après un temps d'incubation très court.**

Le premier indice qui a conduit un certain nombre d'équipes à soupçonner l'existence d'un autre mode d'action pour les stéroïdes que celui habituellement décrit a été l'observation de certains effets de ces molécules qui apparaissaient avec une rapidité incompatible avec la synthèse de protéines. Ainsi (*Von Ledeberg et al.* 2002) ont observé que la testostérone provoquait en 30 secondes une dépolarisation de la membrane des cellules de Sertoli de rat. Toujours concernant les androgènes, (*Benten et al.* 1997) montrèrent que l'ajout de testostérone dans le milieu de culture de lymphocytes T conduisait à un afflux de calcium extra cellulaire en moins d'une minute. Il est aussi connu que le 3 alpha-hydroxy-4-pregnene-20-one, qui est un intermédiaire de synthèse de la progestérone peut modifier en quelques secondes le relargage des gonadotrophines FSH et LH, participant ainsi au rétrocontrôle des stéroïdes sexuel sur leur propre sécrétion.

Nous avons donc mesuré le temps nécessaire à la testostérone pour agir sur les tubules distaux. Les résultats présentés sur la figure 18 nous montrent que le temps d'incubation optimal est de 5 minutes. Au delà, le transport de calcium a tendance à chuter jusqu'à 30 minutes d'incubation. Il s'agit donc d'un temps très court, sans aucune mesure avec les délais d'action généralement observés pour les stéroïdes. Cette donnée est compatible avec les résultats dont nous avons discuté au paragraphe 4. Nous allons donc tenter de mettre en évidence les différents acteurs de la voie de signalisation empruntée par les androgènes dans les cellules distales du néphron de lapin.



## 5.2 La testostérone n'a pas d'effet direct sur les vésicules membranaires.

La concentration en cholestérol au sein de la bicouche lipidique est un facteur important dans la régulation de la rigidité de cette structure ainsi que de la fluidité avec laquelle les protéines membranaires pourront se déplacer dans le sens longitudinal mais aussi dans le plan transversal (transfert d'une demi couche lipidique à l'autre) de la membrane. Outre des variations des paramètres physiques de la membrane, la concentration de cholestérol peut modifier le fonctionnement de certaines protéines transmembranaires parmi lesquelles les canaux et les ATPases ioniques figurent en bonne place. Ainsi en 1997, l'équipe de Mandel a démontré que la concentration de cholestérol dans les membranes des cellules du tubule collecteur de la médulla interne rénale pouvait modifier les propriétés de fixation des cristaux d'oxalate de calcium à ces cellules. Ces résultats confirmaient la thèse selon laquelle la capacité des membranes à former des zones d'attachement cristallines dépendait de leur faculté de réarrangement (*Bigelow et al.* 1997).

Nous avons vu au paragraphe 1.3.1 de l'introduction que les hormones stéroïdes provoquent des variations dans le fonctionnement de certaines protéines membranaires. L'équipe de Reichen a d'ailleurs publié en 1984 une étude démontrant que la concentration en éthinylestradiol des membranes cellulaires affectait le taux d'excrétion de la bile par les hépatocytes de rat (*Berr et al.* 1984). Les auteurs remarquèrent aussi que ce phénomène était accompagné par une réduction de l'efficacité des  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPases dans ces cellules.

Ces résultats nous ont conduit à déterminer si la testostérone pouvait agir directement sur les vésicules membranaires indépendamment du contenu cytoplasmique des cellules distales. La figure 19 montre qu'après 5 minutes d'incubation de l'hormone en présence des vésicules, il n'y a aucun effet sur le transport de calcium. Cette donnée est importante car elle suppose que des éléments présents dans le cytoplasme ou le noyau sont nécessaires pour observer le phénomène. Nous pouvons dès lors exclure l'activation des canaux calciques par une modification de la composition lipidique de la bicouche membranaire suite à

l'intégration des androgènes dans celle-ci. De plus, la testostérone ne se fixe pas à une des sous-unités du canal calcique. Il n'y a donc pas d'activation directe. En outre, même si l'hormone se fixe sur un récepteur placé sur la membrane de la cellule, celui-ci n'est pas couplé directement aux canaux calciques de type T. Un certain nombre d'intermédiaires intracellulaires est donc nécessaire pour ouvrir le canal.

### **5.3 La testostérone agit selon un mode d'action non génomique.**

#### *5.3.1 L'augmentation du transport de calcium est indépendante de la transcription*

La cycloheximide est un antifongique qui a la propriété d'inhiber la transcription dans les cellules eucaryotes (*Jean et al.* 1974). Cette molécule a été largement utilisée dans les études portant sur les effets rapides des stéroïdes. Ainsi, en 1994 (*Gutierrez et al.* 1994) ont investigué les effets de la progestérone, de l'oestradiol, de la testostérone et de l'alphaxolone sur la relaxation du tissu musculaire utérin préalablement stimulé au KCl. Leurs résultats ont illustré le fait que tous ces stéroïdes inhibaient la contraction de façon dose dépendante et que la cycloheximide n'avait aucune conséquence sur ces effets.

(*Leung et al.* 2001) ont démontré que la testostérone et la DHT diminuaient la sécrétion de chlore par les cellules épithéliales de l'épididyme de rat. L'effet est visible après 10 à 20 secondes de traitement par la testostérone. Les auteurs ont donc choisi la cycloheximide pour confirmer que la voie de signalisation impliquée ne dépendait pas de la synthèse protéique. La figure 20 expose les données que nous avons obtenues avec cet inhibiteur. Le transport de calcium stimulé par la testostérone est significativement différent du contrôle en présence et en absence de cycloheximide. Ce résultat confirme l'hypothèse que nous avons émise en analysant le temps nécessaire à la testostérone pour agir. La transcription ne fait donc pas partie de la voie de signalisation étudiée dans notre modèle.

### 5.3.2 L'augmentation du transport de calcium est indépendante du récepteur aux androgènes AR

Récemment, AR, PR, et ER ont montré leur capacité à interagir avec les tyrosine kinases intracellulaires de la classe des SRC, et notamment c-SRC. Classiquement, l'activation de cette molécule est déclenchée au niveau de la face interne de la membrane plasmique par myristylation de son extrémité amino terminale. Une des cibles de cette kinase est la protéine adaptatrice Shc qui est un régulateur placé en amont de la cascade des MAP kinases. Son induction par c-SRC est impliquée dans un grand nombre de phénomènes comme la migration, la prolifération et la différenciation. En réponse à la DHT ou à la testostérone, AR interagit avec le domaine SH3 de c-SRC. Cette association déclenche l'activation de la fonction kinase de c-SRC en 1 minute dans la lignée de cellules cancéreuse prostatique LNCaP (*Migliaccio et al.* 2000). Ces auteurs ont ensuite observé la stimulation de deux membres de la cascade des MAP kinases (Raf-1 et ERK-2) en 2 et 5 minutes respectivement. Ce résultat a été confirmé dans la lignée cellulaire ostéocytaire MLO-Y4 grâce à un traitement par 10 nM de DHT pendant 2 minutes (*Kousteni et al.* 2001). La rapidité de ces phénomènes suggérait fortement un mécanisme non génomique.

Ainsi, AR est susceptible d'agir selon un mode d'action différent de sa fixation sur les séquences ARE des gènes sous la dépendance transcriptionnelle des androgènes. Nous avons donc voulu déterminer si ces nouvelles propriétés de AR étaient responsables de la rapidité du phénomène observé. Pour ce faire, nous avons utilisé deux inhibiteurs spécifiques de AR : l'acétate de cyprotérone (stéroïdien) et la flutamide (non stéroïdien). Les résultats des figures 21 et 22 démontrent que ces deux molécules sont inefficaces pour bloquer le transport de calcium et donc que AR ne semble pas faire partie de la cascade signalétique activée dans notre modèle. AR étant localisé dans le cytoplasme, la testostérone pourrait-elle se fixer et interagir avec un récepteur membranaire différent de AR ?

### 5.3.3 La testostérone agit au niveau membranaire.

Pour répondre à cette question, nous avons utilisé de la testostérone couplée à la BSA. En effet, la grande taille de la sérum albumine bovine empêche le stéroïde de pénétrer dans la cellule ce qui permet de discriminer le site d'action en fonction du résultat obtenu. Cette technique a été largement utilisée par la plupart des équipes travaillant sur les effets rapides des stéroïdes. Ainsi, outre la testostérone et la DHT, les minéralocorticoïdes, les oestrogènes et la progestérone ont aussi été couplés à cette molécule.

La figure 23 montre que le transport de calcium reste significativement différent du contrôle lorsque les cellules distales sont stimulées par la testostérone-BSA. Dans notre modèle, les androgènes agissent donc sans entrer dans la cellule et donc a priori en se fixant à la membrane. L'existence d'un nouveau récepteur membranaire aux androgènes a déjà été évoquée par un certain nombre d'auteurs qui s'appuyaient sur des expériences de liaison aux membranes plasmiques de différents types cellulaires (*Benten et al.* 1999b) (*Benten et al.* 1999a). La capacité des androgènes à rapidement moduler l'activité des canaux ioniques et à modifier la concentration calcique intracellulaire a aussi été observée par ces mêmes équipes. Par exemple, dans les cellules de Sertoli, la testostérone et la DHT sont capables d'activer des canaux calciques membranaires de type L sensibles au vérapamil (*Steinsapir et al.* 1991). Malheureusement, ce récepteur n'a jamais pu être purifié ou cloné, nous privant ainsi d'une caractérisation plus approfondie. Dans ces conditions, 2 hypothèses peuvent être posées. Dans notre modèle, ce récepteur membranaire n'est de toute façon pas sensible ni à l'acétate de cyprotérone, ni à la flutamide. Il s'agirait donc d'un récepteur différent de AR.

La première hypothèse se fonde sur les études qui ont réussi à identifier EGFR comme étant une structure membranaire nécessaire aux actions non génomiques de nombreux stéroïdes. Dès 1992 (*Ignar-Trowbridge et al.* 1992) signalaient une interdépendance possible entre les cascades de signaux déclenchés par ER et celles dépendantes de EGFR. En 2002, (*Gekle et al.* 2002) ont montré que

dans les cellules MDCK, les oestrogènes pouvaient provoquer une augmentation de la concentration calcique intracellulaire accompagnée d'une activation de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  et de la phosphorylation de ERK-1 et 2. Les auteurs montrèrent que ces phénomènes dépendaient de la présence de EGFR.

*5.3.4 La PKA et la PKC ne font pas partie de la cascade signalétique conduisant à l'ouverture des canaux calciques dans les cellules distales.*

La deuxième hypothèse concernant le type de structure responsable de la fixation de la testostérone sur la membrane cellulaire serait de considérer l'existence d'un récepteur couplé à une protéine G et capable de permettre la transduction du signal délivré par la testostérone. Or, PKC et PKA sont toutes deux activées suite à la fixation d'un ligand sur ce type de récepteur. Cette protéine peut stimuler 1) l'adénylate cyclase et donc d'induire une augmentation de la concentration en AMPc indispensable pour stimuler la PKA, et 2) l'induction de la PLC qui dégrade le  $\text{PIP}_2$  en  $\text{IP}_3$  et DAG. DAG permet alors à la PKC de phosphoryler un grand nombre de substrats intracellulaires dont les MAP kinases et certains facteurs de transcription. Or, ces événements peuvent être déclenchés très rapidement par un grand nombre de stéroïdes.

Ainsi, la corticostérone inhibe l'influx calcique induit par la nicotine dans les cellules PC12. Cet effet est pertussis toxine et PKC sensible (Qiu *et al.* 1998). (Park *et al.* 2001) ont aussi démontré que les glucocorticoïdes inhibent la réabsorption des ions phosphates dans le tubule proximal de façon non génomique, en activant la PKC via la PLC. Dans les ostéoblastes, la synthèse d' $\text{IP}_3$  et de DAG est stimulée rapidement par la progestérone (Grosse *et al.* 2000) et par la testostérone (Lieberherr and Grosse 1994). La néomycine (inhibiteur spécifique de la PLC) bloque l'effet stimulateur du  $17\beta$  oestradiol dans les cellules duodénales. Ces effets n'ont pu être mis en évidence que pour les rats femelles ce qui supposerait que les actions

non génomiques des oestrogènes dans ce modèle appartiennent à la catégorie A.II.a de la classification de Mannheim (*Picotto et al.* 1999).

La PKA est aussi susceptible d'être modulée de façon non génomique par les stéroïdes. Par exemple, dans l'ovocyte de xénope qui est naturellement stoppé en phase G2 de la méiose 1, la progestérone déclenche le passage en phase M. La synthèse protéique n'est pas nécessaire à cet effet et les événements biochimiques précoces induisant ce phénomène incluent une diminution de la quantité d'AMPc délivrée par l'adénylate cyclase et donc une baisse de l'activité de la PKA (*Maller and Krebs* 1977). L'équipe de Karolczak a couplé des molécules d'oestrogène avec de la BSA. Lorsqu'elles sont ajoutées au milieu de culture de neurones dopaminergiques, la croissance et l'arborisation des neurites de ces cellules sont stimulées. Ces effets sont inhibés par les antagonistes de la PKA ou par le rp-AMPc. Par contre, ICI1182780, inhibiteur spécifique de ER, est inefficace. Dans ce modèle, les oestrogènes agissent donc en se fixant sur la membrane des neurones et déclenche une voie de signalisation PKA dépendante. (*Beyer and Karolczak* 2000).

D'après ces éléments, il était donc logique de chercher à savoir si la PKC et/ou la PKA étaient impliquées dans la voie de signalisation étudiée dans notre modèle. Or, la figure 24 montre que ni le rp-AMPc ni le calphostin C (bloquant respectivement PKA et PKC) n'ont d'effets sur le transport de calcium stimulé par la testostérone. Pourtant, ce résultat n'exclue pas pour autant la fixation de la testostérone sur un récepteur couplé à une protéine G puisque l'activation de PKA et PKC dépend aussi de la présence de protéines adaptatrices ou encore de la classe des sous-unités de la protéine G concernée. En effet, les protéines G sont constituées de 3 types de sous-unités :  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . En présence de GTP,  $\alpha$  se dissocie de  $\beta/\gamma$ , permettant à  $\alpha$  d'activer une grande variété d'effecteurs jusqu'à ce que GTP soit hydrolysé en GDP. Le système revenait alors à son état initial. La nature des molécules activées dépend des isoformes de chacune des sous-unités : la table 4 résume quelques unes des possibilités existantes pour les  $G\alpha$  :

		Isoformes	Effecteurs
G $\alpha$	$\alpha_s$	$\alpha_{SL1, L2, S1, S2}$	Adénylate cyclase, canaux Ca <sup>2+</sup>
	$\alpha_i$	$\alpha_{i1, i2, i11, i12, i13}$ $\alpha_{o1, o2, \alpha_z}$	Adénylate cyclase, canaux Cl <sup>-</sup> , K <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> cGMP phosphodiesterase
	$\alpha_q$	$\alpha_q, \alpha_{11, 14, 15, 16}$	PLC, MAP kinases
	$\alpha_{12}$	$\alpha_{12, 13}$	PLA <sub>2</sub> , échangeur Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>

Table 5 : Les différents isoformes de G $\alpha$  et leurs effecteurs respectifs.

La PLC est activée par les G $\alpha_q$ . L'adénylate cyclase est stimulée par G $\alpha_s$  et inhibée par G $\alpha_{i1, i2, i3}$  ainsi que par G  $\alpha_{o1, o2}$ . De plus, les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  possèdent respectivement 5 et 12 isoformes. Cette diversité démontre donc que même si PKA et PKC ne sont pas actifs dans notre modèle, la testostérone pourrait très bien se lier à un récepteur couplé à une protéine G.

### 5.3.5 Une activité tyrosine kinase est nécessaire pour que la testostérone stimule la réabsorption du calcium dans le tubule distal.

Le genistein est un inhibiteur des activités tyrosine kinase naturellement présent dans le soja. Or, des expériences effectuées sur des souris TRAMP (transgenic adenocarcinoma mouse prostate) ont montré que le genistein avait un effet protecteur contre le développement de tumeurs prostatiques malignes en provoquant notamment une inhibition indirecte des sérine/thréonine kinase MAP (Wang *et al.* 2004a). Cette observation est d'ailleurs en accord avec le fait que les populations asiatiques soumises à un régime riche en soja présentent des incidences plus faibles pour les manifestations cliniques des tumeurs prostatiques. Du fait de l'effet activateur de la testostérone dans les phases précoces du cancer de la prostate, nous avons testé l'effet du genistein (10<sup>-6</sup>M) sur notre modèle, en présence ou en absence de testostérone (10<sup>-10</sup>M) (figure 25).

Cette fois, l'inhibiteur choisi est efficace : le transport de calcium induit par la testostérone est inhibé. Il existe donc une activité tyrosine kinase dans la voie de signalisation activée par l'hormone. Nous pouvons donc à ce stade émettre deux nouvelles hypothèses :

1 : Le récepteur membranaire dont dépend l'activité non génomique de la testostérone déclenche une cascade signalétique dépendante de l'activation d'une tyrosine kinase cytoplasmique. Parmi les enzymes impliquées, la famille la plus grande est celle des kinases SRC. Elles sont impliquées dans un grand nombre de phénomènes biologiques incluant la prolifération cellulaire, l'activation des lymphocytes T et B ainsi que la restructuration du cytosquelette. En outre, elles peuvent être activées par un récepteur couplé aux protéines G. En effet des observations telles qu'une inhibition du transport de magnésium par les membranes des cellules S49 dépendante de  $G_{\alpha s}$  mais insensible au Rp-AMPC (*Maguire and Erdos* 1980) laissent supposer que les protéines G peuvent déclencher des voies de signalisation différentes de celles décrites précédemment. Dans le même ordre d'idée, (*Gu et al.* 2000) ont montré que l'apoptose pouvait être déclenchée, toujours dans ces cellules S49, indépendamment de la PKA mais après une activation des  $G_{\alpha s}$ . Ces indices ont conduit à identifier les tyrosines kinases de la classe SRC comme étant la clef de ces voies de signalisations supplémentaires. La croissance des fibroblastes est ainsi stimulée lorsque leur récepteur à la thrombine (qui est couplé à une protéine G) est activé. Ce phénomène est pourtant SRC dépendant. Les lymphocytes murins de la lignée S49 ont aussi permis de purifier la protéine  $G_{\alpha s}$  associée au récepteur  $\beta$  adrénergique. Ce résultat a conduit à la démonstration que  $G_{\alpha s}$  peut directement activer SRC. De plus il existe un modèle murin présentant un triple knock-out pour trois tyrosine kinases de la classe SRC (c-SRC, yes et fyn). Dans les fibroblastes de ces souris, les phosphorylations de nombreuses protéines intracellulaires induites par  $G_{\alpha s}$  sont fortement réduites par rapport aux cellules contrôles NIH3T3 (*Ma et al.* 2000). Cette caractéristique est réversible lorsque c-SRC est réintroduite dans les cellules. Les mêmes auteurs ont testé l'efficacité de  $G_{\alpha s}$



mutantes et ont donc identifié les résidus responsables de l'interaction directe avec les tyrosine kinases SRC.

2 : Le récepteur sur lequel se fixerait la testostérone sur la membrane de la cellule tubulaire distale possède une activité tyrosine kinase intrinsèque. C'est le cas de l'EGFR. Comme tous les récepteurs tyrosine kinase (RTK), EGFR est présent à l'état de monomères dans la membrane (à l'exception du récepteur à l'insuline). La fixation du ligand déclenche la dimérisation de ces récepteurs ce qui provoque l'autophosphorylation de leurs domaines cytoplasmiques (*Schlessinger* 1988). Ce phénomène permet le recrutement et l'activation de nombreuses protéines de signalisation. Parmi ces protéines, citons GrB2 qui est susceptible de faire la liaison entre un grand nombre de récepteurs membranaires et la cascade de signalisation des MAP kinases via l'activation de RAS. GrB2 interagit avec le RTK par son domaine SH2 et recrute le facteur SOS de façon à l'amener tout proche de sa protéine cible : RAF.

En outre, EGFR représente une famille de 4 récepteurs dotés d'une activité tyrosine kinase intrinsèque : ErbB1, ErbB2, ErbB3 et ErbB4. De nombreux ligands ont été identifiés (EGF, TGF $\alpha$ , HB-EGF ou neurorégulines) mais aucun ne se fixe à ErbB2. Cependant, en l'absence de données tridimensionnelles sur la structure du complexe EGFR, il est tout à fait possible d'émettre l'hypothèse selon laquelle ErbB2 est responsable de la capacité de EGFR à fixer des ligands non identifiés, et parmi ceux-ci des hormones stéroïdes comme l'ont démontré (*Croxtall et al.* 2000). D'après cette étude, il existe une interaction entre les glucocorticoïdes et EGFR conduisant à l'inhibition des facteurs de transcriptions normalement activés lorsqu'EGFR est stimulé. ErbB2 pourrait donc constituer un partenaire hétérodimérique avec les autres membres de la famille EGFR, capable de fixer d'autres ligands comme les stéroïdes, ou bien encore jouer le rôle de plateforme additionnelle pour le recrutement de EGFR par de nouveaux signaux extracellulaires.

### 5.3.6 La sérine/thréonine kinase ERK est activée par la testostérone.

Parmi les équipes qui ont étudié les effets rapides des stéroïdes, la plupart ont relevé l'implication des MAP kinases dans les voies de signalisation étudiées et ce, dans un grand nombre de modèles. Concernant plus particulièrement les androgènes, le R1881 (androgène synthétique) à 1 nM stimule rapidement la phosphorylation de ERK dans les cellules PMC42 issues de tumeurs mammaires (Whiting *et al.* 2000). La DHT peut aussi activer ERK1 et ERK2 dans les cellules prostatiques LLNCaP (Peterziel *et al.* 1999). Au niveau du rein, il est connu que les souris femelles sont plus résistantes aux pathologies reliées aux phénomènes d'ischémie/reperfusion. Bien que la supplémentation en œstrogènes puisse réduire la susceptibilité du mâle à ces désordres, c'est surtout la présence d'androgènes qui joue un rôle critique dans ce tableau. Ils agissent en modifiant la phosphorylation de ERK dépendante de l'activation post-ischémique de akt (Park *et al.* 2004).

Or, il existe un inhibiteur spécifique des kinases ERK 1 et 2 : le PD98059. Nous l'avons donc testé dans notre modèle et avons observé une forte diminution du transport de calcium induit par la testostérone (figure 27). De plus, nous avons voulu aussi confirmer ce résultat dans un autre modèle. C'est la raison pour laquelle une culture de cellules MDCK a été initiée. Cette lignée cellulaire est issue de tubules rénaux distaux de chien. La démonstration de la pertinence de ce modèle par rapport à la première partie de notre étude a été faite en mesurant l'influx de calcium radioactif dans les cellules MDCK stimulées par la testostérone. Les résultats de la table 4 montrent que l'augmentation du transport de calcium observée dans les tubules distaux de lapin est reproductible dans la lignée cellulaire. Des western blot et des expériences en cytométrie de flux ont donc été effectuées sur les cellules MDCK stimulées par la testostérone couplée ou non à la BSA (figure 28 et 31). ERK 1/2 phosphorylé est détecté sous la forme d'un doublet à 42 kDa et 27% des cellules traitées à la testostérone ( $10^{-10}$ M) sont devenues fluorescentes lorsque ERK 1/2 phosphorylé a été marqué par un anticorps couplé au FITC. De même, lorsque

l'anticorps utilisé était spécifique de MEK (MAP kinase kinase spécifique de ERK), 92% des cellules ont répondu positivement (figure 32).

Tout comme les autres équipes citées plus haut, nous avons donc nous aussi détecté une relation entre les androgènes et le couple MEK/ERK, dans deux modèles différents. La phosphorylation de ERK est rapide : elle atteint son apogée après 5 minutes d'incubation des cellules MDCK en présence de testostérone (figure 29). Sachant que le transport maximal de calcium par les vésicules issues des cellules distales de lapin est aussi observé après 5 minutes en présence de l'androgène, nous pouvons raisonnablement émettre l'hypothèse d'un lien entre ERK phosphorylé et l'activation des canaux de type T.

Nous avons déjà évoqué au paragraphe 3.3 de la discussion comment la phosphorylation de la sous-unité  $\beta$  du canal calcique de type T pouvait contrôler l'affichage des canaux à la surface de la cellule. ERK 1/2 pourrait donc être directement ou indirectement responsable de cette phosphorylation.

Ces MAP kinases pourraient aussi contrôler le comportement des canaux calciques d'une autre manière. En effet, ERK a montré des capacités d'interaction avec le cytosquelette. Dans les leucocytes, ERK 2 s'associe avec LSP-1 qui, dans ces cellules, est une protéine clef pour l'assemblage des faisceaux d'actine cytosquelettiques (Harrison *et al.* 2004). De même, dans le myoblaste de rat, la phosphorylation de ERK produit l'apparition de formes cellulaires anormales (cellules rondes, structure pseudopodiques) indiquant un dysfonctionnement du cytosquelette. Dans ces conditions, nous pourrions donc avancer l'hypothèse d'un rôle important de ERK dans la gestion du trafic des vésicules cytoplasmiques contenant les canaux calciques de type T. En agissant sur le cytosquelette qui est le 'moteur' des mouvements vésiculaires à l'intérieur de la cellule, ERK exercerait un contrôle sur la quantité de canaux présents à la surface de la cellule.

La testostérone provoque aussi la phosphorylation de ERK en présence d'acétate de cyprotérone, prouvant qu'outre le transport de calcium, AR n'est pas non plus nécessaire à l'activation de ERK. Pourtant, des études comme celle de (Peterziel *et al.* 1999) ont démontré que la stimulation de ERK par la DHT dans les

cellules prostatiques humaines PC3 (AR déficientes) ne pouvait être détectée que lorsque ces cellules étaient transfectées avec AR. Cependant, EGF, en se fixant sur son récepteur, stimule la prolifération de toutes les lignées cellulaires tumorales prostatiques (DUI45, LNCaP et CWR22Rv1) excepté la lignée PC3 (*El Sheikh et al.* 2004). Cette donnée supposerait un mode de fonctionnement de la voie associée à EGFR différent des autres lignées. Cette particularité pourrait donc expliquer la nécessité de la présence de AR dans cette lignée cellulaire pour interagir avec EGFR et déclencher les effets non génomiques de la testostérone.

Dans d'autres systèmes comme par exemple les myoblastes de rat (*Estrada et al.* 2000) ou la lignée LNCaP, ERK est phosphorylée indépendamment de AR et de la PKC (flutamide et GF109203X sont inefficaces) alors que, comme dans notre modèle, une activité tyrosine kinase est nécessaire (*Tong and Tai* 2000).

## **6 Modèle prospectif des effets non génomiques des androgènes sur les cellules du tubule distal.**

La figure 30 nous montre que AG99 inhibe la phosphorylation de ERK par la testostérone. Cet inhibiteur agit tout spécialement au niveau de EGFR. Pourtant aucune donnée dans la littérature ne démontre formellement la capacité de ce récepteur à fixer un stéroïde tel que la testostérone. De plus, AG99 reste un inhibiteur des activités tyrosine kinase, il peut donc potentiellement perturber aussi le fonctionnement de molécules telles que SRC. Dans ces conditions, nous ne pouvons pas exclure la présence dans la voie de signalisation d'un récepteur couplé à une protéine G susceptible de représenter le site de fixation de l'hormone et qui interagirait avec une tyrosine kinase intracellulaire. Sur ces bases, nous avons donc construit le modèle suivant :

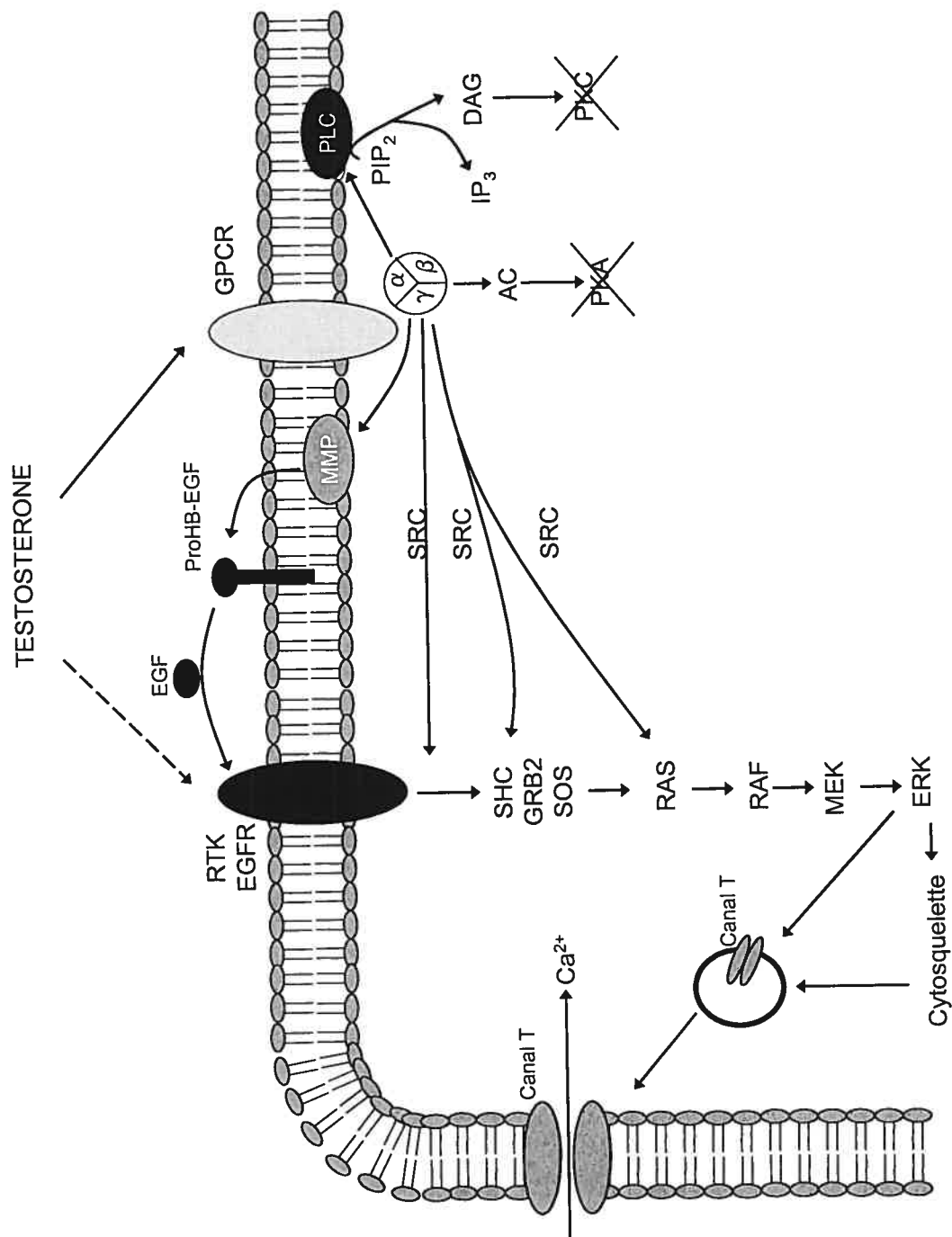


Figure 34 : Modèle théorique des effets non génomiques de la testostérone sur la réabsorption du calcium dans les cellules du tubule distal.

Tout d'abord, un GPCR peut activer une tyrosine kinase de la classe SRC. Tout comme les RTK peuvent phosphoryler et donc activer la protéine adaptatrice SHC, SRC peut aussi déclencher la cascade signalétique des MAP kinases.

La deuxième possibilité passe par un phénomène de transactivation de EGFR par un GPCR et ce, en absence de EGF. Ce mécanisme commence à être bien caractérisé et concerne un grand nombre de GPCR. Ainsi, (Tsai et al. 1997) montrèrent que le récepteur M1 à l'acétylcholine transactive EGFR par un signal PKC dépendant. En particulier, le récepteur GPR30 a été cloné par plusieurs laboratoires. Sa séquence d'acides aminés est caractérisée par une structure à 7 segments hélicoïdaux typiques des GPCR. Pourtant, contrairement aux autres récepteurs de cette classe, il ne semble pas avoir pour ligand une structure peptidique puisque des molécules telles que IL-8, MCP-1, MCP-3 ou encore l'angiotensine II ont été testées sans résultats. Par contre, le fait que dans les cellules MDA-MB-31, la surexpression de GPR30 donne à ces cellules la capacité d'activer ERK en réponse à une stimulation oestrogénique laisse penser que l'oestradiol pourrait être un bon candidat pour le rôle de ligand. GPR30 constitue en fait un des seuls exemples connus de récepteur membranaire capable de se fixer à un stéroïde. Il est différent du récepteur classique à l'oestradiol et permet donc de classer les actions non génomiques de cette hormone dans la catégorie A.II.b de la classification de Mannheim. Or, GPR30 peut activer SRC (Maggiolini et al. 2004) et donc phosphoryler EGFR. Suite à cette transactivation en l'absence de EGF, un stéroïde est donc capable d'induire la phosphorylation de ERK.

La kinase SRC peut aussi activer une metalloprotéase membranaire (MMP). Il existe dans la membrane plasmique une forme inactive de l'EGF liée à l'héparane : proHB-EGF. MMP peut catalyser le clivage de cette molécule de façon à relarguer HB-EGF dans le milieu extra cellulaire. EGFR est ensuite activé et s'autophosphoryle après fixation du HB-EGF. Ainsi, des anticorps dirigés contre HB-EGF ou encore le blocage de la migration de proHB-EGF vers la membrane cellulaire par la toxine diphtérique empêche la phosphorylation de ERK par les oestrogènes.

Une fois ERK activée, nous avons vu un peu plus haut que cette kinase peut, en agissant sur la sous-unité  $\beta$  du canal calcique de type T ou encore indirectement en modifiant les propriétés du cytosquelette, conduire à une augmentation de l'affichage des canaux sur la membrane apicale de la cellule distale, produisant ainsi un influx de calcium dans la cellule. Ce modèle théorique illustre donc les différentes voies de signalisation que l'on peut déduire et extrapoler à partir des résultats de notre étude.

## IV CONCLUSION.

Nous démontrons dans ce travail que la testostérone stimule la réabsorption calcique par les cellules du tubule contourné distal du néphron. Son action provoque un influx de calcium dans ces cellules grâce à une augmentation de la quantité de canaux calciques de type T présents sur la membrane apicale. L'hormone agit à une concentration de  $10^{-10}$ M, proche de la valeur physiologique sanguine et après un temps d'incubation en présence des tubules très court (5 minutes). Or, sa nature stéroïde semble à première vue incompatible avec ces effets rapides, cette classe d'hormone étant connue pour agir à travers un mécanisme impliquant une synthèse protéique et donc un certain temps de latence entre la fixation de l'hormone sur son récepteur et ses effets observables. L'hormone agit en se fixant sur un récepteur membranaire différent du récepteur aux androgènes cytoplasmique classique. De plus, un certain nombre d'éléments intracellulaires sont nécessaires à son action. Nous avons ainsi identifié dans la voie de signalisation étudiée les sérine/thréonine kinases MEK et ERK ainsi qu'une activité tyrosine kinase qui peut indiquer que la testostérone se fixe sur un RTK ou encore qu'une kinase cytoplasmique de la classe SRC est impliquée. Dans cette hypothèse, nous pouvons aussi imaginer que l'androgène se fixe sur un récepteur couplé à une protéine G et que celle-ci amorce la transactivation d'un RTK tel que EGFR.

L'impact de ces résultats sur le plan physiologique n'est pas non plus négligeable. En effet, de plus en plus de traitements basés sur la supplémentation en testostérone sont disponibles sur le marché. Ils sont en général délivrés à des hommes d'un certain âge en réponse à une pathologie liée à l'andropause (ostéoporose, dépression) tout en gardant bien à l'esprit les risques liés aux tumeurs prostatiques de stade androgène dépendant. Dans ces conditions, le fait que les androgènes puissent intervenir dans la régulation de la calciurie devrait inciter à établir une surveillance du taux d'excrétion de calcium chez ces patients. Le



tubule contourné distal n'est évidemment responsable que de 10% de la réabsorption calcique totale mais il constitue le seul segment où ce phénomène est actif et régulé. Il est le siège des ajustements fins de la calciurie.

Ce travail ouvre un certain nombre de perspectives qu'il serait intéressant d'explorer. Par exemple l'identification formelle du récepteur impliqué permettrait de restreindre nos hypothèses quant aux voies de signalisations. Pour ce faire, la testostérone peut être couplée à une molécule capable d'établir des liaisons covalentes avec les structures immédiatement en rapport avec l'androgène, en l'occurrence le récepteur. Après purification de l'ensemble hormone-récepteur et migration sur gel, nous pourrions donc déterminer son poids moléculaire et l'identifier à l'aide d'anticorps ou bien encore en analysant sa structure par spectrométrie de masse. Il serait aussi possible de profiter du fait que les cellules du PCT ne répondent pas aux androgènes. La transfection de ces cellules avec un cDNA codant pour un récepteur candidat nous apporterait la preuve que le récepteur a bien été identifié.

## Liste des références

- Akisaka T, Gay CV (1986) Ultracytochemical evidence for a proton-pump adenosine triphosphatase in chick osteoclasts. *Cell Tissue Res.* **245**, 507-512.
- Aldred JP, Kleszynski RR, Bastian JW (1970) Effects of acute administration of porcine and salmon calcitonin on urine electrolyte excretion in rats. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* **134**, 1175-1180.
- Aloia JF, McGowan DM, Vaswani AN, Ross P, Cohn SH (1991) Relationship of menopause to skeletal and muscle mass. *Am.J.Clin.Nutr.* **53**, 1378-1383.
- Amsterdam JD, Winokur A, Caroff S, Snyder P (1981) Gonadotropin release after administration of GnRH in depressed patients and healthy volunteers. *J.Affect.Disord.* **3**, 367-380.
- Andreasen D, Jensen BL, Hansen PB, Kwon TH, Nielsen S, Skott O (2000) The alpha(1G)-subunit of a voltage-dependent Ca(2+) channel is localized in rat distal nephron and collecting duct. *Am.J.Physiol Renal Physiol* **279**, F997-1005.
- Armbrecht HJ, Wongsurawat VJ, Hodam TL, Wongsurawat N (1996) Insulin markedly potentiates the capacity of parathyroid hormone to increase expression of 25-hydroxyvitamin D3-24-hydroxylase in rat osteoblastic cells in the presence of 1,25-dihydroxyvitamin D3. *FEBS Lett.* **393**, 77-80.
- Armen TA, Gay CV (2000) Simultaneous detection and functional response of testosterone and estradiol receptors in osteoblast plasma membranes. *J.Cell Biochem.* **79**, 620-627.
- Bading H, Ginty DD, Greenberg ME (1993) Regulation of gene expression in hippocampal neurons by distinct calcium signaling pathways. *Science* **260**, 181-186.

Bagowski CP, Myers JW, Ferrell JE, Jr. (2001) The classical progesterone receptor associates with p42 MAPK and is involved in phosphatidylinositol 3-kinase signaling in *Xenopus* oocytes. *J Biol.Chem.* **276**, 37708-37714.

Bai M (1999) Structure and function of the extracellular calcium-sensing receptor (Review). *Int.J.Mol.Med.* **4**, 115-125.

Bai M, Quinn S, Trivedi S, Kifor O, Pearce SH, Pollak MR, Krapcho K, Hebert SC, Brown EM (1996) Expression and characterization of inactivating and activating mutations in the human  $\text{Ca}^{2+}$ -sensing receptor. *J.Biol.Chem.* **271**, 19537-19545.

Bai M, Trivedi S, Lane CR, Yang Y, Quinn SJ, Brown EM (1998) Protein kinase C phosphorylation of threonine at position 888 in  $\text{Ca}^{2+}$ -sensing receptor (CaR) inhibits coupling to  $\text{Ca}^{2+}$  store release. *J.Biol.Chem.* **273**, 21267-21275.

Bailly C, Imbert-Teboul M, Roinel N, Amiel C (1990) Isoproterenol increases Ca, Mg, and NaCl reabsorption in mouse thick ascending limb. *Am.J.Physiol* **258**, F1224-F1231.

Baker PF, Blaustein MP, Hodgkin AL, Steinhardt RA (1969) The influence of calcium on sodium efflux in squid axons. *J.Physiol* **200**, 431-458.

Barlet JP, Gaumet N, Coxam V, Davicco MJ (1998) [Calcitonin and stanniocalcin. Particular aspects of the endocrine regulation of phospho-calcium metabolism in mammals and fish]. *Ann.Endocrinol.(Paris)* **59**, 281-290.

Barrett-Connor E, Von Muhlen DG, Kritz-Silverstein D (1999) Bioavailable testosterone and depressed mood in older men: the Rancho Bernardo Study. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **84**, 573-577.

Barry EL, Gesek FA, Yu AS, Lytton J, Friedman PA (1998a) Distinct calcium channel isoforms mediate parathyroid hormone and chlorothiazide-stimulated calcium entry in transporting epithelial cells. *J.Membr.Biol.* **161**, 55-64.

Barry EL, Gesek FA, Yu AS, Lytton J, Friedman PA (1998b) Distinct calcium channel isoforms mediate parathyroid hormone and chlorothiazide-stimulated calcium entry in transporting epithelial cells. *J.Membr.Biol.* **161**, 55-64.

Baumann CT, Lim CS, Hager GL (1999) Intracellular localization and trafficking of steroid receptors. *Cell Biochem.Biophys.* **31**, 119-127.

Benais-Pont G, Punnett A, Flores-Maldonado C, Eckert J, Raposo G, Fleming TP, Cereijido M, Balda MS, Matter K (2003) Identification of a tight junction-associated guanine nucleotide exchange factor that activates Rho and regulates paracellular permeability. *J.Cell Biol.* **160**, 729-740.

Benten WP, Lieberherr M, Giese G, Wrehlke C, Stamm O, Sekeris CE, Mossmann H, Wunderlich F (1999a) Functional testosterone receptors in plasma membranes of T cells. *FASEB J.* **13**, 123-133.

Benten WP, Lieberherr M, Sekeris CE, Wunderlich F (1997) Testosterone induces  $\text{Ca}^{2+}$  influx via non-genomic surface receptors in activated T cells. *FEBS Lett.* **407**, 211-214.

Benten WP, Lieberherr M, Stamm O, Wrehlke C, Guo Z, Wunderlich F (1999b) Testosterone signaling through internalizable surface receptors in androgen receptor-free macrophages. *Mol.Biol.Cell* **10**, 3113-3123.

Berr F, Simon FR, Reichen J (1984) Ethynylestradiol impairs bile salt uptake and Na-K pump function of rat hepatocytes. *Am.J.Physiol* **247**, G437-G443.

Berrevoets CA, Doesburg P, Steketee K, Trapman J, Brinkmann AO (1998) Functional interactions of the AF-2 activation domain core region of the human androgen receptor with the amino-terminal domain and with the transcriptional coactivator TIF2 (transcriptional intermediary factor2). *Mol.Endocrinol.* **12**, 1172-1183.

Beyer C, Karolczak M (2000) Estrogenic stimulation of neurite growth in midbrain dopaminergic neurons depends on cAMP/protein kinase A signalling. *J.Neurosci.Res.* **59**, 107-116.

Bhasin S, Storer TW, Berman N, Callegari C, Clevenger B, Phillips J, Bunnell TJ, Tricker R, Shirazi A, Casaburi R (1996) The effects of supraphysiologic doses of testosterone on muscle size and strength in normal men. *N.Engl.J.Med.* **335**, 1-7.

Bigelow MW, Wiessner JH, Kleinman JG, Mandel NS (1997) The dependence on membrane fluidity of calcium oxalate crystal attachment to IMCD membranes. *Calcif.Tissue Int.* **60**, 375-379.

Bilezikian JP, Morishima A, Bell J, Grumbach MM (1998) Increased bone mass as a result of estrogen therapy in a man with aromatase deficiency. *N.Engl.J.Med.* **339**, 599-603.

Bindels RJ, Ramakers PL, Dempster JA, Hartog A, Van Os CH (1992) Role of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange in transcellular Ca<sup>2+</sup> transport across primary cultures of rabbit kidney collecting system. *Pflugers Arch.* **420**, 566-572.

Bindels RJ, Timmermans JA, Hartog A, Coers W, Van Os CH (1991) Calbindin-D9k and parvalbumin are exclusively located along basolateral membranes in rat distal nephron. *J.Am.Soc.Nephrol.* **2**, 1122-1129.

Blanchard A, Jeunemaitre X, Coudol P, Dechaux M, Froissart M, May A, Demontis R, Fournier A, Paillard M, Houillier P (2001) Paracellin-1 is critical for magnesium and calcium reabsorption in the human thick ascending limb of Henle. *Kidney Int.* **59**, 2206-2215.

Blankenship KA, Williams JJ, Lawrence MS, McLeish KR, Dean WL, Arthur JM (2001) The calcium-sensing receptor regulates calcium absorption in MDCK cells by inhibition of PMCA. *Am.J.Physiol Renal Physiol* **280**, F815-F822.

Blaustein MP, Lederer WJ (1999) Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev.* **79**, 763-854.

Boonyaratanakornkit V, Scott MP, Ribon V, Sherman L, Anderson SM, Maller JL, Miller WT, Edwards DP (2001) Progesterone receptor contains a proline-rich motif that directly interacts with SH3 domains and activates c-Src family tyrosine kinases. *Mol.Cell* **8**, 269-280.

Booth AG, Kenny AJ (1974) A rapid method for the preparation of microvilli from rabbit kidney. *Biochem.J.* **142**, 575-581.

Bouhtiauy I, Lajeunesse D, Brunette MG (1991) The mechanism of parathyroid hormone action on calcium reabsorption by the distal tubule. *Endocrinology* **128**, 251-258.

Bouhtiauy I, Lajeunesse D, Brunette MG (1993) Effect of vitamin D depletion on calcium transport by the luminal and basolateral membranes of the proximal and distal nephrons. *Endocrinology* **132**, 115-120.

Bouhtiauy I, Lajeunesse D, Christakos S, Brunette MG (1994a) Two vitamin D3-dependent calcium binding proteins increase calcium reabsorption by different mechanisms. I. Effect of CaBP 28K. *Kidney Int.* **45**, 461-468.

Bouhtiauy I, Lajeunesse D, Christakos S, Brunette MG (1994b) Two vitamin D3-dependent calcium binding proteins increase calcium reabsorption by different mechanisms. II. Effect of CaBP 9K. *Kidney Int.* **45**, 469-474.

Bourdeau JE, Burg MB (1979) Voltage dependence of calcium transport in the thick ascending limb of Henle's loop. *Am.J.Physiol* **236**, F357-F364.

Bradshaw KD, Waterman MR, Couch RT, Simpson ER, Zuber MX (1987) Characterization of complementary deoxyribonucleic acid for human adrenocortical 17 alpha-hydroxylase: a probe for analysis of 17 alpha-hydroxylase deficiency. *Mol.Endocrinol.* **1**, 348-354.

- Bremner WJ, Vitiello MV, Prinz PN (1983) Loss of circadian rhythmicity in blood testosterone levels with aging in normal men. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **56**, 1278-1281.
- Brinkmann AO (2001) Lessons to be learned from the androgen receptor. *Eur.J Dermatol.* **11**, 301-303.
- Brooks JH, Reddon JR (1996) Serum testosterone in violent and nonviolent young offenders. *J.Clin.Psychol.* **52**, 475-483.
- Brown EM (1982) PTH secretion in vivo and in vitro. Regulation by calcium and other secretagogues. *Miner.Electrolyte Metab* **8**, 130-150.
- Brown EM (2000) The extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -sensing receptor: central mediator of systemic calcium homeostasis. *Annu.Rev.Nutr.* **20**, 507-533.
- Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R, Kifor O, Sun A, Hediger MA, Lytton J, Hebert SC (1993) Cloning and characterization of an extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* **366**, 575-580.
- Brown EM, Hebert SC (1997) Calcium-receptor-regulated parathyroid and renal function. *Bone* **20**, 303-309.
- Brunette MG, Blouin S, Chan M (1987) High affinity  $\text{Ca}^{2+}$  - $\text{Mg}^{2+}$  ATPase in the distal tubule of the mouse kidney. *Can.J.Physiol Pharmacol.* **65**, 2093-2098.
- Brunette MG, Chabardes D, Imbert-Teboul M, Clique A, Montegut M, Morel F (1979) Hormone-sensitive adenylate cyclase along the nephron of genetically hypophosphatemic mice. *Kidney Int.* **15**, 357-369.
- Brunette MG, Chan M, Ferriere C, Roberts KD (1978) Site of  $1,25(\text{OH})_2$  vitamin D3 synthesis in the kidney. *Nature* **276**, 287-289.
- Brunette MG, Hilal G, Mailloux J, Leclerc M (2000) G proteins regulate calcium channels in the luminal membranes of the rabbit nephron. *Nephron* **85**, 238-247.

Brunette MG, Kremer R, Lachapelle J Un cas d'hypercalcémie idiopathique inusité. S'agit-il d'un nouveau type ? 26eme réunion du club de recherche clinique, Bromont, Qc 28-30 sept 1995 – abstrat No 124.

Brunette MG, Leclerc M (2001) Effect of estrogen on calcium and sodium transport by the nephron luminal membranes. *J.Endocrinol.* **170**, 441-450.

Brunette MG, Leclerc M, Couchourel D, Mailloux J, Bourgeois Y (2004) Characterization of three types of calcium channel in the luminal membrane of the distal nephron. *Can.J.Physiol Pharmacol.* **82**, 30-37.

Brunette MG, Mailloux J, Lajeunesse D (1992a) Calcium transport by the luminal membrane of distal tubule: II. Effect of pH, electrical potential and calcium channel inhibitors. *Kidney Int.* **41**, 289-296.

Brunette MG, Mailloux J, Lajeunesse D (1992b) Calcium transport through the luminal membrane of the distal tubule. I. Interrelationship with sodium. *Kidney Int.* **41**, 281-288.

Brunette MG, Taleb L, Carriere S (1973) Effect of parathyroid hormone on phosphate reabsorption along the nephron of the rat. *Am.J.Physiol* **225**, 1076-1081.

Brzozowski AM, Pike AC, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T, Engstrom O, Ohman L, Greene GL, Gustafsson JA, Carlquist M (1997) Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* **389**, 753-758.

Burns-Cox N, Gingell C (1997) The andropause: fact or fiction? *Postgrad.Med.J.* **73**, 553-556.

Burr DB (1997) Muscle strength, bone mass, and age-related bone loss. *J.Bone Miner.Res.* **12**, 1547-1551.



Bushinsky DA, Riera GS, Favus MJ, Coe FL (1985) Response of serum 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> to variation of ionized calcium during chronic acidosis. *Am.J.Physiol* **249**, F361-F365.

Butters RR, Jr., Chattopadhyay N, Nielsen P, Smith CP, Mithal A, Kifor O, Bai M, Quinn S, Goldsmith P, Hurwitz S, Krapcho K, Busby J, Brown EM (1997) Cloning and characterization of a calcium-sensing receptor from the hypercalcemic New Zealand white rabbit reveals unaltered responsiveness to extracellular calcium. *J.Bone Miner.Res.* **12**, 568-579.

Cai Q, Chandler JS, Wasserman RH, Kumar R, Penniston JT (1993) Vitamin D and adaptation to dietary calcium and phosphate deficiencies increase intestinal plasma membrane calcium pump gene expression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**, 1345-1349.

Canick JA, Makris A, Gunsalus GL, Ryan KJ (1979) Testicular aromatization in immature rats: localization and stimulation after gonadotropin administration in vivo. *Endocrinology* **104**, 285-288.

Cano E, Mahadevan LC (1995) Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *Trends Biochem.Sci.* **20**, 117-122.

Chambers TJ (1982) Osteoblasts release osteoclasts from calcitonin-induced quiescence. *J.Cell Sci.* **57**, 247-260.

Chambers TJ, Magnus CJ (1982) Calcitonin alters behaviour of isolated osteoclasts. *J.Pathol.* **136**, 27-39.

Chang CS, Kokontis J, Liao ST (1988) Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptors. *Science* **240**, 324-326.

Chang W, Chen TH, Pratt S, Shoback D (2000) Amino acids in the second and third intracellular loops of the parathyroid Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor mediate efficient coupling to phospholipase C. *J.Biol.Chem.* **275**, 19955-19963.

Chapman ER, Jahn R (1994) Calcium-dependent interaction of the cytoplasmic region of synaptotagmin with membranes. Autonomous function of a single C2-homologous domain. *J.Biol.Chem.* **269**, 5735-5741.

Chemin J, Monteil A, Briquaire C, Richard S, Perez-Reyes E, Nargeot J, Lory P (2000) Overexpression of T-type calcium channels in HEK-293 cells increases intracellular calcium without affecting cellular proliferation. *FEBS Lett.* **478**, 166-172.

Chen KS, Deluca HF (1995) Cloning of the human 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D-3 24-hydroxylase gene promoter and identification of two vitamin D-responsive elements. *Biochim.Biophys.Acta* **1263**, 1-9.

Chen YD, Kraemer FB, Reaven GM (1980) Identification of specific high density lipoprotein-binding sites in rat testis and regulation of binding by human chorionic gonadotropin. *J.Biol.Chem.* **255**, 9162-9167.

Christ M, Eisen C, Meyer C, Theisen K, Wehling M (1995) Immediate effects of aldosterone on diacylglycerol production and protein kinase C translocation in vascular smooth muscle cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **213**, 123-129.

Christ M, Sippel K, Eisen C, Wehling M (1994) Non-classical receptors for aldosterone in plasma membranes from pig kidneys. *Mol.Cell Endocrinol.* **99**, R31-R34.

Christakos S, Brunette MG, Norman AW (1981) Localization of immunoreactive vitamin D-dependent calcium binding protein in chick nephron. *Endocrinology* **109**, 322-324.

Christakos S, Gabrielides C, Rhoten WB (1989) Vitamin D-dependent calcium binding proteins: chemistry, distribution, functional considerations, and molecular biology. *Endocr.Rev.* **10**, 3-26.

Clozel JP, Ertel EA, Ertel SI (1997) Discovery and main pharmacological properties of mibefradil (Ro 40-5967), the first selective T-type calcium channel blocker. *J.Hypertens.Suppl* **15**, S17-S25.

Cribbs LL, Lee JH, Yang J, Satin J, Zhang Y, Daud A, Barclay J, Williamson MP, Fox M, Rees M, Perez-Reyes E (1998) Cloning and characterization of  $\alpha 1H$  from human heart, a member of the T-type  $Ca^{2+}$  channel gene family. *Circ.Res.* **83**, 103-109.

Croxtall JD, Choudhury Q, Flower RJ (2000) Glucocorticoids act within minutes to inhibit recruitment of signalling factors to activated EGF receptors through a receptor-dependent, transcription-independent mechanism. *Br.J.Pharmacol.* **130**, 289-298.

Dardenne O, Prud'homme J, Arabian A, Glorieux FH, St Arnaud R (2001) Targeted inactivation of the 25-hydroxyvitamin D(3)-1( $\alpha$ )-hydroxylase gene (CYP27B1) creates an animal model of pseudovitamin D-deficiency rickets. *Endocrinology* **142**, 3135-3141.

Davidson JM, Chen JJ, Crapo L, Gray GD, Greenleaf WJ, Catania JA (1983a) Hormonal changes and sexual function in aging men. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **57**, 71-77.

Davidson JM, Chen JJ, Crapo L, Gray GD, Greenleaf WJ, Catania JA (1983b) Hormonal changes and sexual function in aging men. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **57**, 71-77.

Davies RH, Harris B, Thomas DR, Cook N, Read G, Riad-Fahmy D (1992) Salivary testosterone levels and major depressive illness in men. *Br.J.Psychiatry* **161**, 629-632.

Dechaud H, Lejeune H, Garoscio-Cholet M, Mallein R, Pugeat M (1989) Radioimmunoassay of testosterone not bound to sex-steroid-binding protein in plasma. *Clin.Chem.* **35**, 1609-1614.

Deenadayalu VP, White RE, Stallone JN, Gao X, Garcia AJ (2001) Testosterone relaxes coronary arteries by opening the large-conductance, calcium-activated potassium channel. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* **281**, H1720-H1727.

Deslypere JP, Kaufman JM, Vermeulen T, Vogelaers D, Vandalem JL, Vermeulen A (1987) Influence of age on pulsatile luteinizing hormone release and responsiveness of the gonadotrophs to sex hormone feedback in men. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **64**, 68-73.

Deslypere JP, Vermeulen A (1984) Leydig cell function in normal men: effect of age, life-style, residence, diet, and activity. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **59**, 955-962.

Dick IM, Liu J, Glendenning P, Prince RL (2003) Estrogen and androgen regulation of plasma membrane calcium pump activity in immortalized distal tubule kidney cells. *Mol.Cell Endocrinol.* **212**, 11-18.

Dintinger T, Gaillard JL, Zwain I, Bouhamidi R, Silberzahn P (1989) Synthesis and aromatization of 19-norandrogens in the stallion testis. *J.Steroid Biochem.* **32**, 537-544.

Ebnet K, Aurrand-Lions M, Kuhn A, Kiefer F, Butz S, Zander K, Meyer zu Brickwedde MK, Suzuki A, Imhof BA, Vestweber D (2003) The junctional adhesion molecule (JAM) family members JAM-2 and JAM-3 associate with the cell polarity protein PAR-3: a possible role for JAMs in endothelial cell polarity. *J.Cell Sci.* **116**, 3879-3891.

Edwards BR, Baer PG, Sutton RA, Dirks JH (1973) Micropuncture study of diuretic effects on sodium and calcium reabsorption in the dog nephron. *J.Clin.Invest* **52**, 2418-2427.

El Sheikh SS, Domin J, Abel P, Stamp G, Lalani e (2004) Phosphorylation of both EGFR and ErbB2 is a reliable predictor of prostate cancer cell proliferation in response to EGF. *Neoplasia.* **6**, 846-853.

Ellison KE, Ingelfinger JR, Pivor M, Dzau VJ (1989) Androgen regulation of rat renal angiotensinogen messenger RNA expression. *J.Clin.Invest* **83**, 1941-1945.

Estrada M, Liberona JL, Miranda M, Jaimovich E (2000) Aldosterone- and testosterone-mediated intracellular calcium response in skeletal muscle cell cultures. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* **279**, E132-E139.

Falkenstein E, Norman AW, Wehling M (2000) Mannheim classification of nongenomically initiated (rapid) steroid action(s). *J.Clin.Endocrinol.Metab* **85**, 2072-2075.

Feldman HA, Longcope C, Derby CA, Johannes CB, Araujo AB, Coviello AD, Bremner WJ, McKinlay JB (2002) Age trends in the level of serum testosterone and other hormones in middle-aged men: longitudinal results from the Massachusetts male aging study. *J Clin.Endocrinol.Metab* **87**, 589-598.

Finkelstein BS, Silvers JB, Marrero U, Neuhauser D, Cuttler L (1998) Insurance coverage, physician recommendations, and access to emerging treatments: growth hormone therapy for childhood short stature. *JAMA* **279**, 663-668.

Firsov D, Bellanger AC, Marsy S, Elalouf JM (1995) Quantitative RT-PCR analysis of calcitonin receptor mRNAs in the rat nephron. *Am.J.Physiol* **269**, F702-F709.

Fishman J, Goto J (1981) Mechanism of estrogen biosynthesis. Participation of multiple enzyme sites in placental aromatase hydroxylations. *J.Biol.Chem.* **256**, 4466-4471.

Friedman PA (1988) Basal and hormone-activated calcium absorption in mouse renal thick ascending limbs. *Am.J.Physiol* **254**, F62-F70.

Friedman PA, Coutermarsh BA, Kennedy SM, Gesek FA (1996) Parathyroid hormone stimulation of calcium transport is mediated by dual signaling mechanisms involving protein kinase A and protein kinase C. *Endocrinology* **137**, 13-20.

Garabedian M, Holick MF, Deluca HF, Boyle IT (1972) Control of 25-hydroxycholecalciferol metabolism by parathyroid glands. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **69**, 1673-1676.

Garcia NH, Ramsey CR, Knox FG (1998) Understanding the Role of Paracellular Transport in the Proximal Tubule. *News Physiol Sci.* **13**, 38-43.

Garnier M, Boujrad N, Oke BO, Brown AS, Riond J, Ferrara P, Shoyab M, Suarez-Quian CA, Papadopoulos V (1993) Diazepam binding inhibitor is a paracrine/autocrine regulator of Leydig cell proliferation and steroidogenesis: action via peripheral-type benzodiazepine receptor and independent mechanisms. *Endocrinology* **132**, 444-458.

Gekle M, Freudinger R, Mildenerberger S, Silbernagl S (2002) Aldosterone interaction with epidermal growth factor receptor signaling in MDCK cells. *Am.J.Physiol Renal Physiol* **282**, F669-F679.

Giorgi A, Weatherby RP, Murphy PW (1999) Muscular strength, body composition and health responses to the use of testosterone enanthate: a double blind study. *J.Sci.Med.Sport* **2**, 341-355.

Goldstone AD, Koenig H, Lu CY (1983) Androgenic stimulation of endocytosis, amino acid and hexose transport in mouse kidney cortex involves increased calcium fluxes. *Biochim.Biophys.Acta* **762**, 366-371.

Goodenough DA (1999) Plugging the leaks. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**, 319-321.

Gray A, Feldman HA, McKinlay JB, Longcope C (1991) Age, disease, and changing sex hormone levels in middle-aged men: results of the Massachusetts Male Aging Study. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **73**, 1016-1025.

Gray RW, Garthwaite TL, Phillips LS (1983) Growth hormone and triiodothyronine permit an increase in plasma 1,25(OH)<sub>2</sub>D concentrations in response to dietary phosphate deprivation in hypophysectomized rats. *Calcif.Tissue Int.* **35**, 100-106.

Grosse B, Kachkache M, Le M, V, Lieberherr M (2000) Membrane signalling and progesterone in female and male osteoblasts. I. Involvement Of intracellular Ca(2+), inositol trisphosphate, and diacylglycerol, but not cAMP. *J.Cell Biochem.* **79**, 334-345.

Gu C, Ma YC, Benjamin J, Littman D, Chao MV, Huang XY (2000) Apoptotic signaling through the beta -adrenergic receptor. A new Gs effector pathway. *J.Biol.Chem.* **275**, 20726-20733.

Gustafsson J, Pousette K (1975) Demonstration and partial characterization of cytosol receptors for testosterone. *Biochemistry* **14**, 3094-3101.

Gutierrez M, Martinez V, Cantabrana B, Hidalgo A (1994) Genomic and non-genomic effects of steroidal drugs on smooth muscle contraction in vitro. *Life Sci.* **55**, 437-443.

Gyllenberg J, Rasmussen SL, Borch-Johnsen K, Heitmann BL, Skakkebaek NE, Juul A (2001) Cardiovascular risk factors in men: The role of gonadal steroids and sex hormone-binding globulin. *Metabolism* **50**, 882-888.

Hagenfeldt Y, Eriksson HA (1988) The estrogen receptor in the rat kidney. Ontogeny, properties and effects of gonadectomy on its concentration. *J.Steroid Biochem.* **31**, 49-56.

Hammerland LG, Krapcho KJ, Garrett JE, Alasti N, Hung BC, Simin RT, Levinthal C, Nemeth EF, Fuller FH (1999) Domains determining ligand specificity for Ca<sup>2+</sup> receptors. *Mol.Pharmacol.* **55**, 642-648.

Harman SM, Metter EJ, Tobin JD, Pearson J, Blackman MR (2001) Longitudinal effects of aging on serum total and free testosterone levels in healthy men. Baltimore Longitudinal Study of Aging. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **86**, 724-731.

Harrison RE, Sikorski BA, Jongstra J (2004) Leukocyte-specific protein 1 targets the ERK/MAP kinase scaffold protein KSR and MEK1 and ERK2 to the actin cytoskeleton. *J.Cell Sci.* **117**, 2151-2157.

Hauache OM, Hu J, Ray K, Spiegel AM (2000) Functional interactions between the extracellular domain and the seven-transmembrane domain in  $\text{Ca}^{2+}$  receptor activation. *Endocrine*. **13**, 63-70.

Hoenderop JG, Dardenne O, Van Abel M, Van Der Kemp AW, Van Os CH, Arnaud R, Bindels RJ (2002a) Modulation of renal  $\text{Ca}^{2+}$  transport protein genes by dietary  $\text{Ca}^{2+}$  and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in 25-hydroxyvitamin D3-1 $\alpha$ -hydroxylase knockout mice. *FASEB J*. **16**, 1398-1406.

Hoenderop JG, De Pont JJ, Bindels RJ, Willems PH (1999a) Hormone-stimulated  $\text{Ca}^{2+}$  reabsorption in rabbit kidney cortical collecting system is cAMP-independent and involves a phorbol ester-insensitive PKC isotype. *Kidney Int*. **55**, 225-233.

Hoenderop JG, Hartog A, Stuiver M, Doucet A, Willems PH, Bindels RJ (2000) Localization of the epithelial  $\text{Ca}^{2+}$  channel in rabbit kidney and intestine. *J.Am.Soc.Nephrol*. **11**, 1171-1178.

Hoenderop JG, Nilius B, Bindels RJ (2002b) Molecular mechanism of active  $\text{Ca}^{2+}$  reabsorption in the distal nephron. *Annu.Rev.Physiol* **64**, 529-549.

Hoenderop JG, van der Kemp AW, Hartog A, van de Graaf SF, van Os CH, Willems PH, Bindels RJ (1999c) Molecular identification of the apical  $\text{Ca}^{2+}$  channel in 1, 25-dihydroxyvitamin D3-responsive epithelia. *J.Biol.Chem*. **274**, 8375-8378.

Hoenderop JG, Van Der Kemp AW, Hartog A, van de Graaf SF, Van Os CH, Willems PH, Bindels RJ (1999b) Molecular identification of the apical  $\text{Ca}^{2+}$  channel in 1, 25-dihydroxyvitamin D3-responsive epithelia. *J.Biol.Chem*. **274**, 8375-8378.

Hughes MR, Brumbaugh PF, Hussler MR, Wergedal JE, Baylink DJ (1975) Regulation of serum 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 by calcium and phosphate in the rat. *Science* **190**, 578-580.

Huntson D.L (1975) Two Techniques for evaluating small molecule-macro binding in complex system. *Anal.Biochem*. **63**, 99-109.



Ignar-Trowbridge DM, Nelson KG, Bidwell MC, Curtis SW, Washburn TF, McLachlan JA, Korach KS (1992) Coupling of dual signaling pathways: epidermal growth factor action involves the estrogen receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89**, 4658-4662.

Ishizuka S, Kurihara N, Hakeda S, Maeda N, Ikeda K, Kumegawa M, Norman AW (1988) 1 alpha,25-Dihydroxyvitamin D3[1 alpha,25-(OH)2D3]-26,23-lactone inhibits 1,25-(OH)2D3-mediated fusion of mouse bone marrow mononuclear cells. *Endocrinology* **123**, 781-786.

Jannini EA, Screponi E, Carosa E, Pepe M, Lo GF, Trimarchi F, Benvenga S (1999) Lack of sexual activity from erectile dysfunction is associated with a reversible reduction in serum testosterone. *Int.J Androl* **22**, 385-392.

Jean JH, Ben Porat T, Kaplan AS (1974) Early functions of the genome of herpesvirus. 3. Inhibition of the transcription of the viral genome in cells treated with cycloheximide early during the infective process. *Virology* **59**, 516-523.

Johnson L, Zane RS, Petty CS, Neaves WB (1984) Quantification of the human Sertoli cell population: its distribution, relation to germ cell numbers, and age-related decline. *Biol.Reprod.* **31**, 785-795.

Kantoff PW, Febbo PG, Giovannucci E, Krithivas K, Dahl DM, Chang G, Hennekens CH, Brown M, Stampfer MJ (1997) A polymorphism of the 5 alpha-reductase gene and its association with prostate cancer: a case-control analysis. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* **6**, 189-192.

Kawashima H, Kraut JA, Kurokawa K (1982) Metabolic acidosis suppresses 25-hydroxyvitamin in D3-1alpha-hydroxylase in the rat kidney. Distinct site and mechanism of action. *J.Clin.Invest* **70**, 135-140.

Kelly MH, Hamilton JR (1970) A micro-technique for the assay of intestinal alkaline phosphatase. Results in normal children and in children with celiac disease. *Clin.Biochem.* **3**, 33-43.

Kerstetter JE, O'Brien KO, Insogna KL (2003) Dietary protein, calcium metabolism, and skeletal homeostasis revisited. *Am.J.Clin.Nutr.* **78**, 584S-592S.

Kifor O, Diaz R, Butters R, Brown EM (1997) The  $\text{Ca}^{2+}$ -sensing receptor (CaR) activates phospholipases C, A2, and D in bovine parathyroid and CaR-transfected, human embryonic kidney (HEK293) cells. *J.Bone Miner.Res.* **12**, 715-725.

Kip SN, Strehler EE (2003) Characterization of PMCA isoforms and their contribution to transcellular  $\text{Ca}^{2+}$  flux in MDCK cells. *Am.J.Physiol Renal Physiol* **284**, F122-F132.

Kittur SD, Hoppener JW, Antonarakis SE, Daniels JD, Meyers DA, Maestri NE, Jansen M, Korneluk RG, Nelkin BD, Kazazian HH, Jr. (1985) Linkage map of the short arm of human chromosome 11: location of the genes for catalase, calcitonin, and insulin-like growth factor II. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **82**, 5064-5067.

Koh ET, Owen WL, Om AS (1996) Exogenous oestrogen affects calcium metabolism differently from exogenous testosterone in ovariectomized or orchietomized rats fed a high fructose diet severely deficient in magnesium. *Magnes.Res.* **9**, 23-31.

Kousteni S, Bellido T, Plotkin LI, O'Brien CA, Bodenner DL, Han L, Han K, DiGregorio GB, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS, Roberson PK, Weinstein RS, Jilka RL, Manolagas SC (2001) Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell* **104**, 719-730.

Krause W, Muller HH (2000) Relation of sexual dysfunction to hormone levels, diseases and drugs used in andrological patients. *Urol.Int.* **64**, 143-148.

Kurbel S, Radic R, Kotromanovic Z, Puseljic Z, Kratofil B (2003) A calcium homeostasis model: orchestration of fast acting PTH and calcitonin with slow calcitriol. *Med.Hypotheses* **61**, 346-350.

Labrie F, Belanger A, Cusan L, Candas B (1997) Physiological changes in dehydroepiandrosterone are not reflected by serum levels of active androgens and estrogens but of their metabolites: intracrinology. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **82**, 2403-2409.

Lacinova L, Klugbauer N, Hofmann F (2000) Regulation of the calcium channel  $\alpha(1G)$  subunit by divalent cations and organic blockers. *Neuropharmacology* **39**, 1254-1266.

Lafond J, Ayotte N, Brunette MG (1993) Effect of (1-34) parathyroid hormone-related peptide on the composition and turnover of phospholipids in syncytiotrophoblast brush border and basal plasma membranes of human placenta. *Mol.Cell Endocrinol.* **92**, 207-214.

Lajeunesse D, Brunette MG (1991) The hypocalciuric effect of thiazides: subcellular localization of the action. *Pflugers Arch.* **417**, 454-462.

Larsson D, Nemere I (2002) Vectorial Transcellular Calcium Transport in Intestine: Integration of Current Models. *J.Biomed.Biotechnol.* **2**, 117-119.

Leclerc M, Brunette MG, Couchourel D (2004) Aldosterone enhances renal calcium reabsorption by two types of channels. *Kidney Int.* **66**, 242-250.

Lee JH, Daud AN, Cribbs LL, Lacerda AE, Pereverzev A, Klockner U, Schneider T, Perez-Reyes E (1999) Cloning and expression of a novel member of the low voltage-activated T-type calcium channel family. *J.Neurosci.* **19**, 1912-1921.

Lee SC, Choi S, Lee T, Kim HL, Chin H, Shin HS (2002) Molecular basis of R-type calcium channels in central amygdala neurons of the mouse. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**, 3276-3281.

Leung GP, Cheng-Chew SB, Wong PY (2001) Nongenomic effect of testosterone on chloride secretion in cultured rat efferent duct epithelia. *Am.J.Physiol Cell Physiol* **280**, C1160-C1167.

Li YC, Amling M, Pirro AE, Priemel M, Meuse J, Baron R, Delling G, Demay MB (1998) Normalization of mineral ion homeostasis by dietary means prevents hyperparathyroidism, rickets, and osteomalacia, but not alopecia in vitamin D receptor-ablated mice. *Endocrinology* **139**, 4391-4396.

Li Z, Matsuoka S, Hryshko LV, Nicoll DA, Bersohn MM, Burke EP, Lifton RP, Philipson KD (1994) Cloning of the NCX2 isoform of the plasma membrane Na(+)-Ca<sup>2+</sup> exchanger. *J.Biol.Chem.* **269**, 17434-17439.

Lieberherr M, Grosse B (1994) Androgens increase intracellular calcium concentration and inositol 1,4,5-trisphosphate and diacylglycerol formation via a pertussis toxin- sensitive G-protein. *J.Biol.Chem.* **269**, 7217-7223.

Lieberherr M, Grosse B, Kachkache M, Balsan S (1993) Cell signaling and estrogens in female rat osteoblasts: a possible involvement of unconventional nonnuclear receptors. *J Bone Miner.Res.* **8**, 1365-1376.

Loffing J, Loffing-Cueni D, Valderrabano V, Klausli L, Hebert SC, Rossier BC, Hoenderop JG, Bindels RJ, Kaissling B (2001b) Distribution of transcellular calcium and sodium transport pathways along mouse distal nephron. *Am.J.Physiol Renal Physiol* **281**, F1021-F1027.

Loffing J, Loffing-Cueni D, Valderrabano V, Klausli L, Hebert SC, Rossier BC, Hoenderop JG, Bindels RJ, Kaissling B (2001a) Distribution of transcellular calcium and sodium transport pathways along mouse distal nephron. *Am.J.Physiol Renal Physiol* **281**, F1021-F1027.

Lu HK, Fern RJ, Luthin D, Linden J, Liu LP, Cohen CJ, Barrett PQ (1996) Angiotensin II stimulates T-type Ca<sup>2+</sup> channel currents via activation of a G protein, Gi. *Am.J.Physiol* **271**, C1340-C1349.

Lubahn DB, Joseph DR, Sullivan PM, Willard HF, French FS, Wilson EM (1988) Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. *Science* **240**, 327-330.

Ma YC, Huang J, Ali S, Lowry W, Huang XY (2000) Src tyrosine kinase is a novel direct effector of G proteins. *Cell* **102**, 635-646.

Maggiolini M, Vivacqua A, Fasanella G, Recchia AG, Sisci D, Pezzi V, Montanaro D, Musti AM, Picard D, Ando S (2004) The G protein-coupled receptor GPR30 mediates c-fos up-regulation by 17beta-estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells. *J.Biol.Chem.* **279**, 27008-27016.

Maguire ME, Erdos JJ (1980) Inhibition of magnesium uptake by beta-adrenergic agonists and prostaglandin E1 is not mediated by cyclic AMP. *J.Biol.Chem.* **255**, 1030-1035.

Mahmoud AM, Goemaere S, El Garem Y, Van P, I, Comhaire FH, Kaufman JM (2003) Testicular volume in relation to hormonal indices of gonadal function in community-dwelling elderly men. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **88**, 179-184.

Majewska MD, Demirgoren S, Spivak CE, London ED (1990) The neurosteroid dehydroepiandrosterone sulfate is an allosteric antagonist of the GABAA receptor. *Brain Res.* **526**, 143-146.

Makin G, Lohnes D, Byford V, Ray R, Jones G (1989) Target cell metabolism of 1,25-dihydroxyvitamin D3 to calcitroic acid. Evidence for a pathway in kidney and bone involving 24-oxidation. *Biochem.J.* **262**, 173-180.

Maller JL, Krebs EG (1977) Progesterone-stimulated meiotic cell division in *Xenopus* oocytes. Induction by regulatory subunit and inhibition by catalytic subunit of adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J.Biol.Chem.* **252**, 1712-1718.

Martel C, Rheaume E, Takahashi M, Trudel C, Couet J, Luu-The V, Simard J, Labrie F (1992) Distribution of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene expression and activity in rat and human tissues. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **41**, 597-603.

Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D, Dejana E (1998) Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J.Cell Biol.* **142**, 117-127.

Matsumoto T, Ikeda K, Morita K, Fukumoto S, Takahashi H, Ogata E (1987) Blood  $\text{Ca}^{2+}$  modulates responsiveness of renal 25(OH)D<sub>3</sub>-1 alpha-hydroxylase to PTH in rats. *Am.J.Physiol* **253**, E503-E507.

Matsuzaki K, Arai T, Inumaru T, Mihori M, Momose T, Sano M, Koide K, Shimizu N (1998) Androgen metabolism in cultured rat renal inner medullary collecting duct (IMCD) cells. *Steroids* **63**, 105-110.

McConnell JD, Wilson JD, George FW, Geller J, Pappas F, Stoner E (1992) Finasteride, an inhibitor of 5 alpha-reductase, suppresses prostatic dihydrotestosterone in men with benign prostatic hyperplasia. *J Clin.Endocrinol.Metab* **74**, 505-508.

McDonnel AC, Murdoch WJ (2001) High-dose progesterone inhibition of urokinase secretion and invasive activity by SKOV-3 ovarian carcinoma cells: evidence for a receptor-independent nongenomic effect on the plasma membrane. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **78**, 185-191.

Migliaccio A, Castoria G, Di Domenico M, De Falco A, Bilancio A, Lombardi M, Barone MV, Ametrano D, Zannini MS, Abbondanza C, Auricchio F (2000) Steroid-induced androgen receptor-oestradiol receptor beta-Src complex triggers prostate cancer cell proliferation. *EMBO J.* **19**, 5406-5417.

Monla YT, Peleg S, Gagel RF, Monia YT (1995) Cell type-specific regulation of transcription by cyclic adenosine 3,'5'-monophosphate-responsive elements within the calcitonin promoter. *Mol.Endocrinol.* **9**, 784-793.

Monteil A, Chemin J, Bourinet E, Mennessier G, Lory P, Nargeot J (2000) Molecular and functional properties of the human alpha(1G) subunit that forms T-type calcium channels. *J.Biol.Chem.* **275**, 6090-6100.

Monti PM, Brown WA, Corriveau DP (1977) Testosterone and components of aggressive and sexual behavior in man. *Am.J.Psychiatry* **134**, 692-694.

Morita K, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S (1999) Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**, 511-516.

Mullins LJ (1979) The generation of electric currents in cardiac fibers by Na/Ca exchange. *Am.J.Physiol* **236**, C103-C110.

Murayama A, Takeyama K, Kitanaka S, Kodera Y, Hosoya T, Kato S (1998) The promoter of the human 25-hydroxyvitamin D3 1 alpha-hydroxylase gene confers positive and negative responsiveness to PTH, calcitonin, and 1 alpha,25(OH)2D3. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **249**, 11-16.

Murphy TH, Worley PF, Baraban JM (1991) L-type voltage-sensitive calcium channels mediate synaptic activation of immediate early genes. *Neuron* **7**, 625-635.

Nakajin S, Shinoda M, Hall PF (1986) Purification to homogeneity of aromatase from human placenta. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **134**, 704-710.

Nakajin S, Shinoda M, Haniu M, Shively JE, Hall PF (1984) C21 steroid side chain cleavage enzyme from porcine adrenal microsomes. Purification and characterization of the 17 alpha-hydroxylase/C17,20-lyase cytochrome P-450. *J.Biol.Chem.* **259**, 3971-3976.

Neaves WB, Johnson L, Petty CS (1987) Seminiferous tubules and daily sperm production in older adult men with varied numbers of Leydig cells. *Biol.Reprod.* **36**, 301-308.

Ohtake K, Maeno T, Ueda H, Ogihara M, Natsume H, Morimoto Y (2003) Poly-L-arginine enhances paracellular permeability via serine/threonine phosphorylation of ZO-1 and tyrosine dephosphorylation of occludin in rabbit nasal epithelium. *Pharm.Res.* **20**, 1838-1845.

Pappas TC, Gametchu B, Watson CS (1995) Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding. *FASEB J* **9**, 404-410.

Park KM, Kim JI, Ahn Y, Bonventre AJ, Bonventre JV (2004) Testosterone is responsible for enhanced susceptibility of males to ischemic renal injury. *J.Biol.Chem.* **279**, 52282-52292.

Park S, Taub M, Han H (2001) Regulation of phosphate uptake in primary cultured rabbit renal proximal tubule cells by glucocorticoids: evidence for nongenomic as well as genomic mechanisms. *Endocrinology* **142**, 710-720.

Paul SM, Purdy RH (1992) Neuroactive steroids. *FASEB J* **6**, 2311-2322.

Peng JB, Chen XZ, Berger UV, Vassilev PM, Brown EM, Hediger MA (2000) A rat kidney-specific calcium transporter in the distal nephron. *J.Biol.Chem.* **275**, 28186-28194.

Perez-Reyes E, Cribbs LL, Daud A, Lacerda AE, Barclay J, Williamson MP, Fox M, Rees M, Lee JH (1998) Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature* **391**, 896-900.

Peterziel H, Mink S, Schonert A, Becker M, Klocker H, Cato AC (1999) Rapid signalling by androgen receptor in prostate cancer cells. *Oncogene* **18**, 6322-6329.



Phillips SK, Rook KM, Siddle NC, Bruce SA, Woledge RC (1993) Muscle weakness in women occurs at an earlier age than in men, but strength is preserved by hormone replacement therapy. *Clin.Sci.(Lond)* **84**, 95-98.

Pi M, Spurney RF, Tu Q, Hinson T, Quarles LD (2002) Calcium-sensing receptor activation of rho involves filamin and rho-guanine nucleotide exchange factor. *Endocrinology* **143**, 3830-3838.

Picotto G, Vazquez G, Boland R (1999) 17beta-oestradiol increases intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration in rat enterocytes. Potential role of phospholipase C-dependent store-operated Ca<sup>2+</sup> influx. *Biochem.J.* **339** ( Pt 1), 71-77.

Pollak MR, Brown EM, Estep HL, McLaine PN, Kifor O, Park J, Hebert SC, Seidman CE, Seidman JG (1994) Autosomal dominant hypocalcaemia caused by a Ca(2+)-sensing receptor gene mutation. *Nat.Genet.* **8**, 303-307.

Pope HG, Jr., Kouri EM, Hudson JI (2000) Effects of supraphysiologic doses of testosterone on mood and aggression in normal men: a randomized controlled trial. *Arch.Gen.Psychiatry* **57**, 133-140.

POST RL, SEN AK (1965) AN ENZYMATIC MECHANISM OF ACTIVE SODIUM AND POTASSIUM TRANSPORT. *J.Histochem.Cytochem.* **13**, 105-112.

Pugeat M, Crave JC, Elmidani M, Nicolas MH, Garoscio-Cholet M, Lejeune H, Dechaud H, Tourniaire J (1991) Pathophysiology of sex hormone binding globulin (SHBG): relation to insulin. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **40**, 841-849.

Pugeat MM, Dunn JF, Nisula BC (1981) Transport of steroid hormones: interaction of 70 drugs with testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **53**, 69-75.

Qiu J, Lou LG, Huang XY, Lou SJ, Pei G, Chen YZ (1998) Nongenomic mechanisms of glucocorticoid inhibition of nicotine-induced calcium influx in PC12 cells: involvement of protein kinase C. *Endocrinology* **139**, 5103-5108.

Quamme GA (1980) Effect of calcitonin on calcium and magnesium transport in rat nephron. *Am.J.Physiol* **238**, E573-E578.

Quamme GA, Dirks JH (1980) Intraluminal and contraluminal magnesium on magnesium and calcium transfer in the rat nephron. *Am.J.Physiol* **238**, F187-F198.

Quinkler M, Bumke-Vogt C, Meyer B, Bahr V, Oelkers W, Diederich S (2003) The human kidney is a progesterone-metabolizing and androgen-producing organ. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **88**, 2803-2809.

Raeside JI, Renaud RL, Friendship RM (1988) Differences in aromatase activity between Leydig cells from the scrotal and abdominal testis in the naturally unilateral-cryptorchid boar. *Biol.Reprod.* **39**, 566-572.

Ramachandran C, Brunette MG (1989) The renal  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange system is located exclusively in the distal tubule. *Biochem.J.* **257**, 259-264.

Ramos E, Frontera WR, Llopart A, Feliciano D (1998) Muscle strength and hormonal levels in adolescents: gender related differences. *Int.J.Sports Med.* **19**, 526-531.

Reilly RF, Shugrue CA (1992) cDNA cloning of a renal  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger. *Am.J.Physiol* **262**, F1105-F1109.

Riccardi D, Hall AE, Chattopadhyay N, Xu JZ, Brown EM, Hebert SC (1998) Localization of the extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ /polyvalent cation-sensing protein in rat kidney. *Am.J.Physiol* **274**, F611-F622.

Riccardi D, Lee WS, Lee K, Segre GV, Brown EM, Hebert SC (1996) Localization of the extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -sensing receptor and PTH/PTHrP receptor in rat kidney. *Am.J.Physiol* **271**, F951-F956.

Rocha AS, Magaldi JB, Kokko JP (1977) Calcium and phosphate transport in isolated segments of rabbit Henle's loop. *J.Clin.Invest* **59**, 975-983.

Rottbauer W, Baker K, Wo ZG, Mohideen MA, Cantiello HF, Fishman MC (2001) Growth and function of the embryonic heart depend upon the cardiac-specific L-type calcium channel  $\alpha 1$  subunit. *Dev.Cell* **1**, 265-275.

Rouiller V, Gangnerau MN, Vayssiere JL, Picon R (1990) Cholesterol side-chain cleavage activity in rat fetal gonads: a limiting step for ovarian steroidogenesis. *Mol.Cell Endocrinol.* **72**, 111-120.

Rupprecht R, Holsboer F (1999) Neuropsychopharmacological properties of neuroactive steroids. *Steroids* **64**, 83-91.

Russell J, Lettieri D, Sherwood LM (1983) Direct regulation by calcium of cytoplasmic messenger ribonucleic acid coding for pre-parathyroid hormone in isolated bovine parathyroid cells. *J.Clin.Invest* **72**, 1851-1855.

Sack JS, Kish KF, Wang C, Attar RM, Kiefer SE, An Y, Wu GY, Scheffler JE, Salvati ME, Krystek SR, Jr., Weinmann R, Einspahr HM (2001) Crystallographic structures of the ligand-binding domains of the androgen receptor and its T877A mutant complexed with the natural agonist dihydrotestosterone. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**, 4904-4909.

Sands JM, Naruse M, Baum M, Jo I, Hebert SC, Brown EM, Harris HW (1997) Apical extracellular calcium/polyvalent cation-sensing receptor regulates vasopressin-elicited water permeability in rat kidney inner medullary collecting duct. *J.Clin.Invest* **99**, 1399-1405.

Schlessinger J (1988) Signal transduction by allosteric receptor oligomerization. *Trends Biochem.Sci.* **13**, 443-447.

Schmid G, Sala R, Bonanno G, Raiteri M (1998) Neurosteroids may differentially affect the function of two native GABA(A) receptor subtypes in the rat brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* **357**, 401-407.

Schnermann J, Briggs J, Schubert G (1982) In situ studies of the distal convoluted tubule in the rat. I. Evidence for NaCl secretion. *Am.J.Physiol* **243**, F160-F166.

Schreiber M, Schwille PO (1995) Vasectomy in the rat--effects on mineral metabolism, with emphasis on renal tissue minerals and occurrence of urinary stones. *J.Urol.* **153**, 1284-1290.

Sexton PM, Adam WR, Moseley JM, Martin TJ, Mendelsohn FA (1987) Localization and characterization of renal calcitonin receptors by in vitro autoradiography. *Kidney Int.* **32**, 862-868.

Shareghi GR, Agus ZS (1982) Magnesium transport in the cortical thick ascending limb of Henle's loop of the rabbit. *J.Clin.Invest* **69**, 759-769.

Shenk JL, Fisher CJ, Chen SY, Zhou XF, Tillman K, Shemshedini L (2001) p53 represses androgen-induced transactivation of prostate-specific antigen by disrupting hAR amino- to carboxyl-terminal interaction. *J Biol.Chem.* **276**, 38472-38479.

Shimura F, Wasserman RH (1984) Membrane-associated vitamin D-induced calcium-binding protein (CaBP): quantification by a radioimmunoassay and evidence for a specific CaBP in purified intestinal brush borders. *Endocrinology* **115**, 1964-1972.

Shivaji S, Jagannadham MV (1992) Steroid-induced perturbations of membranes and its relevance to sperm acrosome reaction. *Biochim.Biophys.Acta* **1108**, 99-109.

Simon D, Preziosi P, Barrett-Connor E, Roger M, Saint-Paul M, Nahoul K, Papoz L (1992) The influence of aging on plasma sex hormones in men: the Telecom Study. *Am.J.Epidemiol.* **135**, 783-791.

Simon DB, Lu Y, Choate KA, Velazquez H, Al Sabban E, Praga M, Casari G, Bettinelli A, Colussi G, Rodriguez-Soriano J, McCredie D, Milford D, Sanjad S, Lifton RP (1999) Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg<sup>2+</sup> resorption. *Science* **285**, 103-106.

Skakkebaek NE, Bancroft J, Davidson DW, Warner P (1981) Androgen replacement with oral testosterone undecanoate in hypogonadal men: a double blind controlled study. *Clin.Endocrinol.(Oxf)* **14**, 49-61.

Skolnik EY, Lee CH, Batzer A, Vicentini LM, Zhou M, Daly R, Myers MJ, Jr., Backer JM, Ullrich A, White MF, . (1993) The SH2/SH3 domain-containing protein GRB2 interacts with tyrosine-phosphorylated IRS1 and Shc: implications for insulin control of ras signalling. *EMBO J.* **12**, 1929-1936.

Smith EP, Boyd J, Frank GR, Takahashi H, Cohen RM, Specker B, Williams TC, Lubahn DB, Korach KS (1994) Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N.Engl.J.Med.* **331**, 1056-1061.

Soldatov NM (2003) Ca<sup>2+</sup> channel moving tail: link between Ca<sup>2+</sup>-induced inactivation and Ca<sup>2+</sup> signal transduction. *Trends Pharmacol.Sci.* **24**, 167-171.

Song X, Bishop JE, Okamura WH, Norman AW (1998) Stimulation of phosphorylation of mitogen-activated protein kinase by 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in promyelocytic NB4 leukemia cells: a structure-function study. *Endocrinology* **139**, 457-465.

Sorensen OH, Hindberg I, Madsen SN (1972) Secondary hyperparathyroidism in young rats given prolonged treatment with calcitonin. *Acta Endocrinol.(Copenh)* **71**, 313-320.

Steinsapir J, Socci R, Reinach P (1991) Effects of androgen on intracellular calcium of LNCaP cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **179**, 90-96.

Stokoe D, Macdonald SG, Cadwallader K, Symons M, Hancock JF (1994) Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane. *Science* **264**, 1463-1467.

Strewler GJ, Stern PH, Jacobs JW, Eveloff J, Klein RF, Leung SC, Rosenblatt M, Nissenson RA (1987) Parathyroid hormonelike protein from human renal carcinoma

cells. Structural and functional homology with parathyroid hormone. *J.Clin.Invest* **80**, 1803-1807.

Swain LD, Schwartz Z, Caulfield K, Brooks BP, Boyan BD (1993) Nongenomic regulation of chondrocyte membrane fluidity by 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> is dependent on cell maturation. *Bone* **14**, 609-617.

Swartz CM, Young MA (1988) Male hypogonadism and bone fracture. *N.Engl.J.Med.* **318**, 996.

Szabo A, Merke J, Beier E, Mall G, Ritz E (1989) 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> inhibits parathyroid cell proliferation in experimental uremia. *Kidney Int.* **35**, 1049-1056.

Takaichi K, Kurokawa K (1986) High Ca<sup>2+</sup> inhibits peptide hormone-dependent cAMP production specifically in thick ascending limbs of Henle. *Miner.Electrolyte Metab* **12**, 342-346.

Takeda H, Chodak G, Mutchnik S, Nakamoto T, Chang C (1990) Immunohistochemical localization of androgen receptors with mono- and polyclonal antibodies to androgen receptor. *J Endocrinol.* **126**, 17-25.

Talley EM, Cribbs LL, Lee JH, Daud A, Perez-Reyes E, Bayliss DA (1999) Differential distribution of three members of a gene family encoding low voltage-activated (T-type) calcium channels. *J.Neurosci.* **19**, 1895-1911.

Tanaka Y, Castillo L, Wineland MJ, Deluca HF (1978) Synergistic effect of progesterone, testosterone, and estradiol in the stimulation of chick renal 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>-1alpha-hydroxylase. *Endocrinology* **103**, 2035-2039.

Tang VW, Goodenough DA (2003) Paracellular ion channel at the tight junction. *Biophys.J.* **84**, 1660-1673.

Tenover JS (1992) Effects of testosterone supplementation in the aging male. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **75**, 1092-1098.

Tenover JS, McLachlan RI, Dahl KD, Burger HG, de Kretser DM, Bremner WJ (1988) Decreased serum inhibin levels in normal elderly men: evidence for a decline in Sertoli cell function with aging. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **67**, 455-459.

Tong M, Tai HH (2000) Induction of NAD(+)-linked 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase expression by androgens in human prostate cancer cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **276**, 77-81.

Tsai W, Morielli AD, Peralta EG (1997) The m1 muscarinic acetylcholine receptor transactivates the EGF receptor to modulate ion channel activity. *EMBO J.* **16**, 4597-4605.

Tsukita S, Furuse M (2000) Pores in the wall: claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. *J.Cell Biol.* **149**, 13-16.

Vahouny GV, Chanderbhan R, Noland BJ, Scallen TJ (1984) Cholesterol ester hydrolase and sterol carrier proteins. *Endocr.Res.* **10**, 473-505.

van Baal J, Yu A, Hartog A, Fransen JA, Willems PH, Lytton J, Bindels RJ (1996) Localization and regulation by vitamin D of calcium transport proteins in rabbit cortical collecting system. *Am.J.Physiol* **271**, F985-F993.

Van Cromphaut SJ, Dewerchin M, Hoenderop JG, Stockmans I, Van Herck E, Kato S, Bindels RJ, Collen D, Carmeliet P, Bouillon R, Carmeliet G (2001) Duodenal calcium absorption in vitamin D receptor-knockout mice: functional and molecular aspects. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**, 13324-13329.

Vermeulen A, Kaufman JM, Giagulli VA (1996) Influence of some biological indexes on sex hormone-binding globulin and androgen levels in aging or obese males. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **81**, 1821-1826.

Vermeulen A, Verdonck L, Kaufman JM (1999) A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **84**, 3666-3672.

Viard P, Butcher AJ, Halet G, Davies A, Nurnberg B, Hebllich F, Dolphin AC (2004) PI3K promotes voltage-dependent calcium channel trafficking to the plasma membrane. *Nat.Neurosci.* **7**, 939-946.

Vinay P, Gougoux A, Lemieux G (1981) Isolation of a pure suspension of rat proximal tubules. *Am.J.Physiol* **241**, F403-F411.

Von Ledebrur EI, Almeida JP, Loss ES, Wassermann GF (2002) Rapid effect of testosterone on rat Sertoli cell membrane potential. Relationship with K<sup>+</sup>ATP channels. *Horm.Metab Res.* **34**, 550-555.

Wali RK, Baum CL, Sitrin MD, Brasitus TA (1990) 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> stimulates membrane phosphoinositide turnover, activates protein kinase C, and increases cytosolic calcium in rat colonic epithelium. *J Clin.Invest* **85**, 1296-1303.

Wang J, Eltoum IE, Lamartiniere CA (2004a) Genistein alters growth factor signaling in transgenic prostate model (TRAMP). *Mol.Cell Endocrinol.* **219**, 171-180.

Wang WH, Lu M, Hebert SC (1996) Cytochrome P-450 metabolites mediate extracellular Ca<sup>2+</sup>-induced inhibition of apical K<sup>+</sup> channels in the TAL. *Am.J.Physiol* **271**, C103-C111.

Wang Y, Zhang J, Yi XJ, Yu FS (2004b) Activation of ERK1/2 MAP kinase pathway induces tight junction disruption in human corneal epithelial cells. *Exp.Eye Res.* **78**, 125-136.

Warner BA, Dufau ML, Santen RJ (1985) Effects of aging and illness on the pituitary testicular axis in men: qualitative as well as quantitative changes in luteinizing hormone. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **60**, 263-268.

Watts NB, Notelovitz M, Timmons MC, Addison WA, Wiita B, Downey LJ (1995) Comparison of oral estrogens and estrogens plus androgen on bone mineral density, menopausal symptoms, and lipid-lipoprotein profiles in surgical menopause. *Obstet.Gynecol.* **85**, 529-537.



Weber K, Erben RG, Rump A, Adamski J (2001) Gene structure and regulation of the murine epithelial calcium channels ECaC1 and 2. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **289**, 1287-1294.

Wehling M, Spes CH, Win N, Janson CP, Schmidt BM, Theisen K, Christ M (1998) Rapid cardiovascular action of aldosterone in man. *J Clin.Endocrinol.Metab* **83**, 3517-3522.

Wehling M, Ulsenheimer A, Schneider M, Neylon C, Christ M (1994) Rapid effects of aldosterone on free intracellular calcium in vascular smooth muscle and endothelial cells: subcellular localization of calcium elevations by single cell imaging. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **204**, 475-481.

Whiting KP, Restall CJ, Brain PF (2000) Steroid hormone-induced effects on membrane fluidity and their potential roles in non-genomic mechanisms. *Life Sci.* **67**, 743-757.

Wilcox ER, Burton QL, Naz S, Riazuddin S, Smith TN, Ploplis B, Belyantseva I, Ben Yosef T, Liburd NA, Morell RJ, Kachar B, Wu DK, Griffith AJ, Riazuddin S, Friedman TB (2001) Mutations in the gene encoding tight junction claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB29. *Cell* **104**, 165-172.

Williams SP, Sigler PB (1998) Atomic structure of progesterone complexed with its receptor. *Nature* **393**, 392-396.

Wilson FH, Disse-Nicodeme S, Choate KA, Ishikawa K, Nelson-Williams C, Desitter I, Gunel M, Milford DV, Lipkin GW, Achard JM, Feely MP, Dussol B, Berland Y, Unwin RJ, Mayan H, Simon DB, Farfel Z, Jeunemaitre X, Lifton RP (2001) Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. *Science* **293**, 1107-1112.

Wongsurawat N, Armbrecht HJ (1985) Insulin modulates the stimulation of renal 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> production by parathyroid hormone. *Acta Endocrinol.(Copenh)* **109**, 243-248.

Wu S, Finch J, Zhong M, Slatopolsky E, Grieff M, Brown AJ (1996) Expression of the renal 25-hydroxyvitamin D-24-hydroxylase gene: regulation by dietary phosphate. *Am.J.Physiol* **271**, F203-F208.

Yagci A, Werner A, Murer H, Biber J (1992) Effect of rabbit duodenal mRNA on phosphate transport in *Xenopus laevis* oocytes: dependence on 1,25-dihydroxy-vitamin-D3. *Pflugers Arch.* **422**, 211-216.

Yamamoto M, Kawanobe Y, Takahashi H, Shimazawa E, Kimura S, Ogata E (1984) Vitamin D deficiency and renal calcium transport in the rat. *J.Clin.Invest* **74**, 507-513.

Young W.J, Roecker E.B, Weindruch R, Chang C (1994) Quantitation of androgen receptor mRNA by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction. *Endocrine J* **2**, 321-329.

Yue L, Peng JB, Hediger MA, Clapham DE (2001) CaT1 manifests the pore properties of the calcium-release-activated calcium channel. *Nature* **410**, 705-709.

Yumita S, Nicholson GC, Rowe DJ, Kent GN, Martin TJ (1991) Biphasic effect of calcitonin on tartrate-resistant acid phosphatase activity in isolated rat osteoclasts. *J.Bone Miner.Res.* **6**, 591-597.

Zhang JF, Randall AD, Ellinor PT, Horne WA, Sather WA, Tanabe T, Schwarz TL, Tsien RW (1993) Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal Ca<sup>2+</sup> channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons. *Neuropharmacology* **32**, 1075-1088.

Zhang Z, Sun S, Quinn SJ, Brown EM, Bai M (2001) The extracellular calcium-sensing receptor dimerizes through multiple types of intermolecular interactions. *J.Biol.Chem.* **276**, 5316-5322.

Zhao PL, Wang XT, Zhang XM, Cebotaru V, Cebotaru L, Guo G, Morales M, Guggino SE (2002a) Tubular and cellular localization of the cardiac L-type calcium channel in rat kidney. *Kidney Int.* **61**, 1393-1406.

Zhao PL, Wang XT, Zhang XM, Cebotaru V, Cebotaru L, Guo G, Morales M, Guggino SE (2002b) Tubular and cellular localization of the cardiac L-type calcium channel in rat kidney. *Kidney Int.* **61**, 1393-1406.

Zitzmann M, Brune M, Kornmann B, Gromoll J, Junker R, Nieschlag E (2001) The CAG repeat polymorphism in the androgen receptor gene affects bone density and bone metabolism in healthy males. *Clin.Endocrinol.(Oxf)* **55**, 649-657.

Zmuda JM, Cauley JA, Kriska A, Glynn NW, Gutai JP, Kuller LH (1997) Longitudinal relation between endogenous testosterone and cardiovascular disease risk factors in middle-aged men. A 13-year follow-up of former Multiple Risk Factor Intervention Trial participants. *Am.J Epidemiol.* **146**, 609-617.

Zuo Q, Claveau D, Hilal G, Leclerc M, Brunette MG (1997) Effect of calcitonin on calcium transport by the luminal and basolateral membranes of the rabbit nephron. *Kidney Int.* **51**, 1991-1999.

## **Annexe 1**

### **Publications issues de ce travail**

# Testosterone enhances calcium reabsorption by the kidney

Denis Couchourel, Marie Leclerc, Janos Filep, Michèle G. Brunette\*

Guy-Bernier Research Centre, Maisonneuve-Rosemont Hospital, 5415 l'Assomption Blvd, Montreal, Que., Canada H1T 2M4

Received 20 February 2004; received in revised form 29 April 2004; accepted 4 May 2004

## Abstract

The kidney is a target tissue for androgens, but the role of these hormones in the regulation of calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) reabsorption remains unclear. The present study examines the effects of testosterone on  $\text{Ca}^{2+}$  transport by the luminal membranes of proximal and distal nephrons of the rabbit kidney. Tubule suspensions were pre-incubated in the presence or absence of the hormone, and  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake by the luminal membranes was measured using the rapid filtration technique. In the proximal tubules, testosterone did not influence  $\text{Ca}^{2+}$  uptake. In the distal tubules, a 5 min incubation with the hormone increased this uptake with a maximal response at  $10^{-10}$  M.  $\text{Ca}^{2+}$  transport by the distal membranes shows a dual kinetics. Testosterone enhanced the  $V_{\max}$  value of the low affinity component. In an attempt to identify the underlying mechanisms involved in this action, several messenger inhibitors were introduced in the tubule suspension. PD 98059 and U0 126 as well as AG 99 and genistein interfered with the hormone action suggesting the implication of a MEK kinase and a tyrosine kinase. To determine the type of the channels involved in this effect,  $\text{Ca}^{2+}$  uptake was measured in the presence of diltiazem,  $\omega$ -conotoxin MVIIC and mibefradil, i.e. selective inhibitors of the L-type, P/Q type and T-type channels. An inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$  transport was observed exclusively with mibefradil. These results indicate that testosterone enhances  $\text{Ca}^{2+}$  transport by opening a T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel in the distal luminal membrane, via MEK kinase and tyrosine kinase dependent mechanisms.

© 2004 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Testosterone; Renal  $\text{Ca}^{2+}$  reabsorption; Calciuria

## 1. Introduction

Although more subtle than menopause in women, andropause is accompanied by progressive clinical symptoms such as decrease in energy, libido and erectile capacity (Kaiser et al., 1988; Vermeulen, 1991; Feldman et al., 1994) depressed mood (Levitt and Joffe, 1988; Wang et al., 1996; Barrett-Connor et al., 1999; Pope et al., 2003) loss of memory (Moffat et al., 2002), decrease in bone density (Behre et al., 1997b), increase in leptin secretion and in body mass index (Vermeulen, 1991; Behre et al., 1997a; Vermeulen et al., 1999; Rolf et al., 2002) with, as consequences, diabetes and cardiovascular diseases (Vastag, 2003).

Confirming the role of sex hormones in these clinical symptoms, several studies have reported the benefits of androgen replacement in aging men. Not only did testosterone replacement improve the quality of erection and the level of libido (Tenover, 1992; Arver et al., 1996; Shabsigh, 1997; Monga et al., 2002) but the treated men also showed a

body mass index similar to those of younger eugonadal men (Rolf et al., 2002) as well as a decrease in leptin secretion (Katznelson et al., 1996; Behre et al., 1997a; Hislop et al., 1999; Rolf et al., 2002), a decline in the incidence of depression (Altschule and Tillotson, 1948; Wang et al., 1996; Seidman et al., 2001; Pope et al., 2003), an increase in the muscle mass (Bhasin et al., 1997; Wang et al., 2000) and bone density (Katznelson et al., 1996; Behre et al., 1997b; Leifke et al., 1998) and a certain beneficial effect on cognitive function (Okun et al., 2002). For all of these reasons, sales of testosterone and particularly testosterone gel have abruptly risen during the last few years, possibly encouraged, at least in part, by cover-stories in popular magazines.

In addition to the male reproductive tract, the kidney also expresses androgen receptors. Using a synthetic androgen as ligand, Corrales et al. (1985) analyzed the content of cytoplasmic androgen receptors in non-tumoral renal tissue of 12 men and 15 post-menopausal women. The  $B_{\max}$  values in both sexes were similar, in spite of the greater level of circulating testosterone in men. In mouse kidney, testosterone strongly increases mRNA levels (10–20-fold), independently of new synthesis, suggesting a post-transcriptional action (Berger et al., 1986).

\* Corresponding author. Tel.: +1-514-252-3400x3334; fax: +1-514-252-3569.

E-mail address: [REDACTED]

The sites of these receptors along the nephron seem to be relatively extensive, considering the complexity of the hormone action. In mouse proximal tubule cell cultures, dihydrotestosterone enhances the expression of androgen regulated protein genes, and induces the formation of domes (Ouar et al., 1998). Orchiectomy in the same species was shown to induce histological changes in proximal tubules, evoking a female pattern of these tubules (Koenig et al., 1980) and therefore decreasing the morphological sex differences as previously described by Oudar et al. (1991) in rats. In confirmation of the presence of receptors in the proximal tubules, testosterone was reported to affect mitochondrial structure (Koenig et al., 1982) and the transport capacity of amino acid and glucose (Ouar et al., 1998), to stimulate angiotensinogen mRNA and gene expression (Ellison et al., 1989; Ding et al., 1997) and to increase 25(OH) vitamin D  $1\alpha$  hydroxylase (Ellison et al., 1989; Hagenfeldt et al., 1989).

However, the proximal tubule is probably not the only site of testosterone receptors in the kidney. Indeed, some data suggest an interrelationship between testosterone and vasopressin binding sites: Herzberg et al. (1989) for instance, reported that in the aging rat, testosterone administration normalized the otherwise undetectable vasopressin receptors. Likewise, the experiments performed in orchiectomized male and in female rats showed that testosterone increased binding of vasopressin in the collecting tubules (Pavo et al., 1995).

Considering that the kidney is the site of receptors for testosterone, and, as commonly observed in everyday life and confirmed in scientific reports (Robertson et al., 1980; Lee et al., 1992), that males are more susceptible than women to develop  $\text{Ca}^{2+}$  oxalate stones, we questioned whether the hormone directly influences  $\text{Ca}^{2+}$  transport by the nephron, independently of any systemic influence. Results indicate that testosterone not only does not increase calciuria, but rather enhances  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by the distal membrane through a T-type channel.

## 2. Material and method

### 2.1. Tubule preparation

Proximal and distal tubule suspensions were prepared from fresh rabbit kidneys directly obtained from the slaughter house (Zinman Chicken Market, Montreal, Quebec). Superficial cortex was minced and suspended in a cell

culture medium (Dulbecco's modified Eagle medium and Ham's nutrient mix F-12) containing 1 mg/ml collagenase, for 25 min at 35 °C. The suspension was filtered and the filtrate was centrifuged in a clinical centrifuge. The sediment was washed, suspended in 40% Percoll in Krebs Henseleit buffer (KH) equilibrated with 95%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$  and centrifuged for 30 min at  $28,000 \times g$ . The proximal and distal enriched bands were separately collected, washed three times in KH solution, and incubated for 5 min (unless stated otherwise) in a culture medium containing 2% fetal bovine serum, 0.1 mM phenyl methyl-sulfonate fluoride (PMSF), and testosterone at the indicated concentration. In these experiments which were designed to determine the messengers involved in the action of testosterone, the messenger inhibitors were directly introduced with testosterone in the incubation medium. The incubation was stopped by centrifugation and the tubules were suspended in cold 10 mM mannitol, 2 mM Tris-HEPES, pH 7.4. These suspensions were kept frozen at  $-80^\circ\text{C}$  until the day of the experiment.

### 2.2. Luminal membrane purification

On the day of the experiment, the frozen tubule suspensions were thawed, homogenized with 10 strokes of a Potter homogenizer. The luminal membranes from proximal and distal tubules were prepared using the  $\text{MgCl}_2$  precipitation technique. Following addition of 12 mM  $\text{MgCl}_2$  (final concentration), the suspension was stirred on ice for 20 or 10 min for proximal and distal tubule membranes respectively, and centrifuged at  $3000 \times g$  for 20 min at 4 °C. The supernatant was collected and again centrifuged at  $28,000 \times g$  for 30 min at 4 °C. The sedimented membranes were washed twice in 280 mM mannitol, 20 mM Tris-HEPES, pH 7.4, and vesiculated at 4 °C for 1 h.

### 2.3. Enzyme marker measurements

The purity of the tubules and membranes was monitored by measurement of specific enzyme markers (Table 1). Alkaline phosphatase was determined according to the technique of Kelly and Hamilton (1970), and the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase to the technique of Post and Sen (1967). Previous experiments performed with membranes prepared in the same way showed very low activities of succinate dehydrogenase and glucose-6-phosphatase, indicating negligible contamination with mitochondrial and endoplasmic reticulum membranes (Brunette et al., 1992).

Table 1  
Enzyme activities in the various preparations

	Alkaline phosphatase (nmol/(\(\mu\text{g}\) protein 15 min))	$\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase (nmol/(\(\mu\text{g}\) 20 min))
Total cortex tissue	$1.10 \pm 0.14$	$4.40 \pm 0.16$
PT luminal membranes	$11.33 \pm 0.86$ (x 10.3)	$2.63 \pm 0.39$ (x 0.53)
DT luminal membranes	$2.23 \pm 0.27$ (x 2.02)	$0.40 \pm 0.11$ (x 0.01)

x: enrichment compared to the cortex tissue, a parameter indicating the degree of membrane purity. PT: proximal tubule; DT: distal tubule.

#### 2.4. $\text{Ca}^{2+}$ and $\text{Na}^{+}$ uptakes by the luminal membrane vesicles

$^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake, was measured by the rapid Millipore filtration technique. Transport was initiated by adding 25  $\mu\text{l}$  of incubation medium at 35 °C to 5  $\mu\text{l}$  of membrane suspension (approximately 20  $\mu\text{g}$  protein). At the indicated time, uptake was stopped by addition of 1 ml of ice cold stop-solution. The suspension was filtered through Millipore filters (HAWP 0.45  $\mu\text{m}$  pore size). The filters were rinsed with 5 additional ml of stop-solution, and radioactivity retained by the filters was counted. The incubation medium contained, in addition to the  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , either 120 mM  $\text{NaCl}_2$  and 20 mM choline chloride or 140 mM choline chloride, with 20 mM Tris-HEPES, pH 7.4, and when indicated, the intracellular messenger inhibitors: Rp-cAMP, calphostin C, PD 98059 (a MEK kinase inhibitor) and genistein which interferes with a membrane tyrosine kinase receptor. In these experiments, investigating the nature of testosterone-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  channels, the channel inhibitors were added to the incubation medium at the indicated concentration. Most of the experiments were performed with 0.5 mM  $^{45}\text{CaCl}_2$ . The stop-solution contained 150 mM KCl, 20 mM Tris-HEPES, pH 7.4 and 2 mM EGTA.

In the  $^{22}\text{Na}^{+}$  uptake experiments, the incubation medium contained 1 mM  $^{22}\text{NaCl}$ , 279 mM mannitol and 20 mM Tris-HEPES, pH 7.4, and the stop-solution 150 mM LiCl with 20 mM Tris-HEPES at the same pH.

#### 2.5. Statistics and calculations

The results were analyzed by Student's two tailed unpaired *t*-test. The kinetic parameters of the two compounds of  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by the distal luminal membranes, as presented by the Eadie–Hofstee plots, were calculated using the equations described by Huntson (1975).

#### 2.6. Materials

Testosterone was kindly provided by Serva Biochemical Reagents (Islandia, NY, USA). Reagents were purchased from Sigma–Aldrich Fluka (Oakville, ON, Canada).  $^{45}\text{CaCl}_2$  (carrier-free) were obtained from Dupont New England Nuclear Co. (Boston, MA, USA) and the  $\text{Ca}^{2+}$  channel inhibitors, from the Calbiochem company.

### 3. Results

#### 3.1. Effect of testosterone on $\text{Ca}^{2+}$ transport by the brush border membranes of proximal tubules

The effect of testosterone on  $\text{Ca}^{2+}$  transport by the luminal membranes of proximal tubules was investigated using 0.5 mM  $\text{Ca}^{45}\text{Cl}_2$  as the tracer. The tubules had been treated with either  $10^{-10}$  M testosterone or the carrier, for 5 min at 35 °C. Incubation of proximal tubules with the  $10^{-10}$  M of the hormone did not influence  $\text{Ca}^{2+}$  uptake which was  $0.25 \pm 0.08$  and  $0.20 \pm 0.07$  pmol/( $\mu\text{g}$  10 s) in control and experimental conditions, respectively. Incubation with testosterone ranging from  $10^{-12}$  to  $10^{-6}$  M had no significant effect either upon  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by these vesicles ( $0.47 \pm 0.07$ ,  $0.45 \pm 0.05$ ,  $0.45 \pm 0.04$  and  $0.47 \pm 0.07$  pmol/( $\mu\text{g}$  10 s) in membranes from tubules incubated with  $10^{-12}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-8}$  and  $10^{-6}$  M, versus  $0.47 \pm 0.07$  pmol/( $\mu\text{g}$  10 s) in membranes from control tubules ( $n = 3$ ).

#### 3.2. Testosterone enhances $\text{Ca}^{2+}$ transport by the distal luminal membranes

As previously reported (Brunette et al., 1992), the presence of  $\text{Na}^{+}$  in the incubation medium strongly decreases  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by the distal luminal membranes. Therefore,

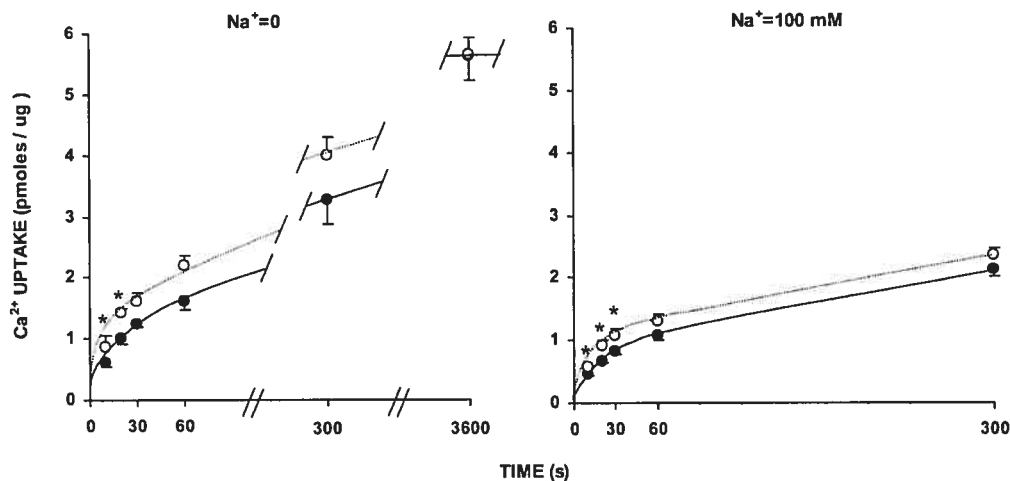


Fig. 1. Effect of a 5 min incubation with  $10^{-10}$  M testosterone on 0.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  transport by the distal luminal membrane tubules in the absence and the presence of 100 mM  $\text{Na}^{+}$ ,  $n = 4$  and 6, respectively. \* $P < 0.05$  compared to the control values. Data are mean  $\pm$  S.E.M. (●) control data from untreated tubules; (○) data from testosterone treated tubules.

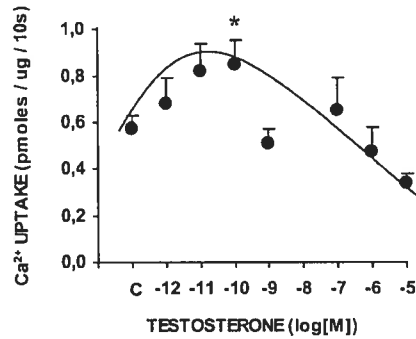


Fig. 2. Effect of testosterone (5 min incubation) on 0.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  transport by the distal luminal membranes: dose-response curve ( $\text{Na}^+ = 0$ ).  $P < 0.05$  compared to the control values,  $n = 7$ .

experiments were performed in the absence and presence of 100 mM  $\text{Na}^+$ . In the absence of  $\text{Na}^+$ , incubation of distal tubules with  $10^{-10}$  M testosterone enhanced 0.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  uptake from  $0.61 \pm 0.08$  to  $0.87 \pm 0.18$  pmol/( $\mu\text{g}$  10 s) ( $P < 0.05$ ,  $n = 4$ ) (Fig. 1a). Although lower in the presence of 100 mM NaCl, the 0.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  uptake remained sensitive to testosterone, increasing from  $0.45 \pm 0.01$  to  $0.56 \pm 0.04$  pmol/( $\mu\text{g}$  10 s) ( $P < 0.05$ ,  $n = 6$ ) (Fig. 1b).

### 3.3. The effect of testosterone on 0.5 mM $\text{Ca}^{2+}$ uptake by the distal luminal membranes: dose-response curve

To investigate whether the observed in vitro stimulation of  $\text{Ca}^{2+}$  transport possibly reflects in vivo mechanisms, we incubated the distal tubules with increasing concentrations of testosterone and subsequently measured the 0.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by the corresponding luminal membranes. The effect of testosterone was indeed dose-dependent, and the dose-response curve presented a biphasic shape with a peak action at  $10^{-10}$  M, a concentration compatible with in vivo values (Fig. 2).

### 3.4. Effect of incubation-time with testosterone on $\text{Ca}^{2+}$ uptake by the distal luminal membranes

The effect of most, if not all, of the  $\text{Ca}^{2+}$  regulating hormones on  $\text{Ca}^{2+}$  transport by the distal luminal membranes is relatively rapid, i.e. within a 1–15 min period, independent of the chemical nature of the hormone, steroid or protein. We questioned whether testosterone follows this general rule. Distal tubules were incubated with  $10^{-10}$  M of the hormone during periods of time varying from 1 to 30 min. The maximal effect was observed after a 5 min incubation, decreasing thereafter (Fig. 3).

### 3.5. Effect of testosterone on the kinetic parameters of $\text{Ca}^{2+}$ transport

We repeatedly observed the existence of at least two types of  $\text{Ca}^{2+}$  channels in the distal luminal membranes with dif-

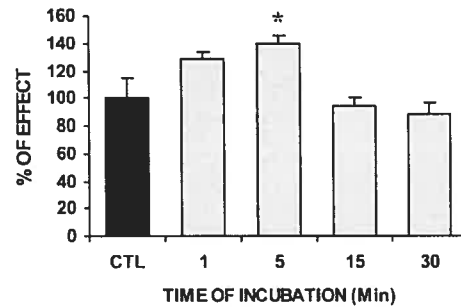


Fig. 3. Effect of  $10^{-10}$  M testosterone on 0.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by the distal luminal membrane. Variation with time of incubation.  $*P < 0.05$  compared to the control values,  $n = 5$ .

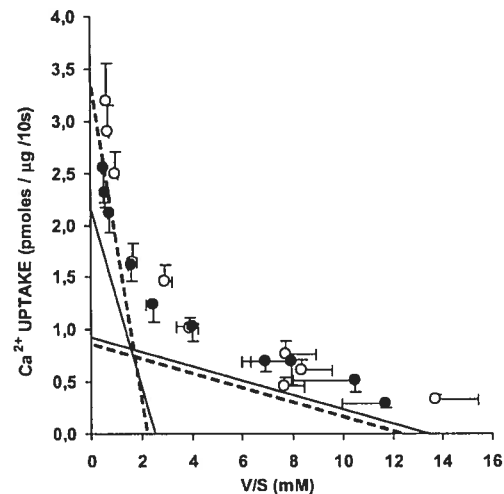


Fig. 4. Effect of  $10^{-10}$  testosterone on 0.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by the distal luminal membrane: Eadie-Hofstee plot,  $n = 8$ .

ferent kinetic parameters. To identify which kinetic component was influenced by testosterone,  $\text{Ca}^{2+}$  uptake was measured with  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations varying from 0.025 to 4.0 mM, in the absence of  $\text{Na}^+$  in the medium. Fig. 4 represents the Eadie-Hofstee plot of these results. Non-linear regression analysis revealed that testosterone enhanced  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by the low affinity channel exclusively, increasing the  $V_{\text{max}}$  value from  $2.11 \pm 0.12$  to  $3.15 \pm 0.29$  pmol/( $\mu\text{g}$  10 s) ( $P < 0.01$ ,  $n = 6$ ) without affecting the  $K_{\text{m}}$  values (Table 2).

Table 2

Effect of  $10^{-10}$  M testosterone on the kinetic parameter of  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by the distal luminal membranes

Kinetic component	Affinity	Control	Testosterone
$K_{\text{m}}$ (mM)	Low	$0.84 \pm 0.12$	$1.35 \pm 0.28$
	High	$0.061 \pm 0.01$	$0.065 \pm 0.01$
$V_{\text{max}}$ (pmol/( $\mu\text{g}$ 10 s))	Low	$2.11 \pm 0.12$	$3.15 \pm 0.29^{\text{a}}$
	High	$0.82 \pm 0.019$	$0.84 \pm 0.20$

<sup>a</sup>  $P < 0.01$  compared to the values obtained with membrane vesicles from untreated tubules control values,  $n = 6$ . Data are mean  $\pm$  S.E.M.



### 3.6. Testosterone increases $\text{Ca}^{2+}$ transport through a non-genomic mechanism

The rapid effect of testosterone suggests a non-genomic action on  $\text{Ca}^{2+}$  transport also suggesting a non-genomic mechanism is the lack of inhibitory effect of both cyproterone and cycloheximide. In this series of experiments, the distal tubules were incubated in medium containing  $10^{-10}$  M testosterone in the absence and presence of  $10^{-5}$  M cyproterone acetate which inhibits the cytoplasmic receptor of testosterone: the  $0.5 \text{ mM } \text{Ca}^{2+}$  uptakes were:  $1.04 \pm 0.09$  and  $0.98 \pm 0.09 \text{ pmol}/(\mu\text{g } 10 \text{ s})$ , i.e. not significantly different (NS),  $n = 5$ , or in the absence and presence of  $10^{-6}$  M cycloheximide, the inhibitor of protein synthesis ( $0.5 \text{ mM } \text{Ca}^{2+}$  uptakes:  $1.29 \pm 0.03$  and  $1.26 \pm 0.04 \text{ pmol}/(\mu\text{g } 10 \text{ s})$ ,

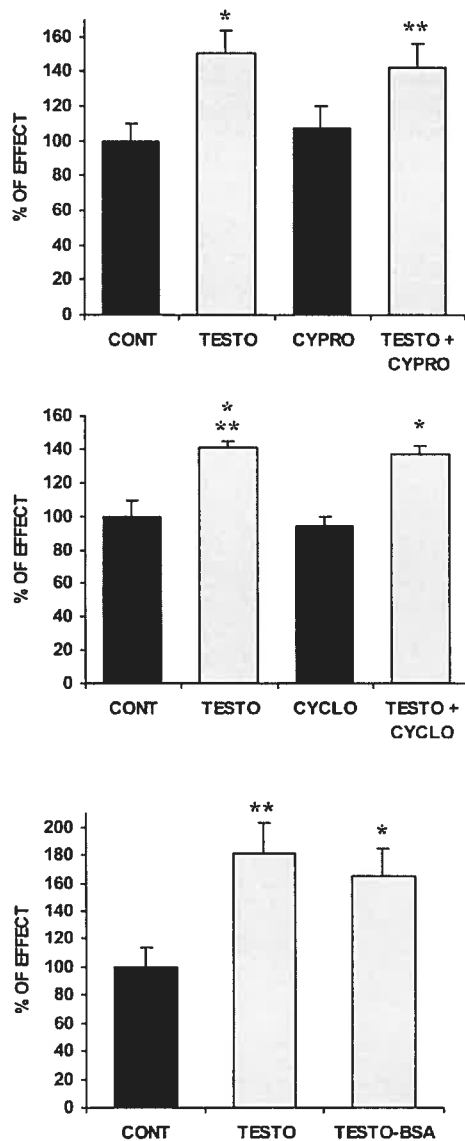


Fig. 5. Effect of  $10^{-5}$  M cyproterone acetate,  $10^{-6}$  M cycloheximide and BSA binding on the testosterone sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  transport. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.02$ , \*\*\* $P < 0.01$  compared to the control values,  $n = 5$ .

NS,  $n = 4$ ). Therefore, none of these two inhibitors interfered with the hormone action upon  $\text{Ca}^{2+}$  uptake. Incubation of the tubules with BSA-testosterone, a non-permeable molecule through membranes, also resulted in a stimulation of  $\text{Ca}^{2+}$  uptake, thus confirming the presence of a non-genomic mechanism (Fig. 5).

### 3.7. The signaling pathways implicated in the testosterone action

To further characterize the action of testosterone on  $\text{Ca}^{2+}$  transport, we investigated the effect of selective inhibitors of several signaling pathways i.e. Rp-cAMP the cyclic-AMP inhibitor, calphostin C the anti-protein kinase C (PKC), PD 98059 which inhibits the MEK kinase (a mitogen activated protein kinase) and genistein which inhibits tyrosine kinase receptors. As shown in Fig. 6a,  $10^{-4}$  M calphostin C and  $10^{-4}$  M Rp cAMP did not interfere with the action

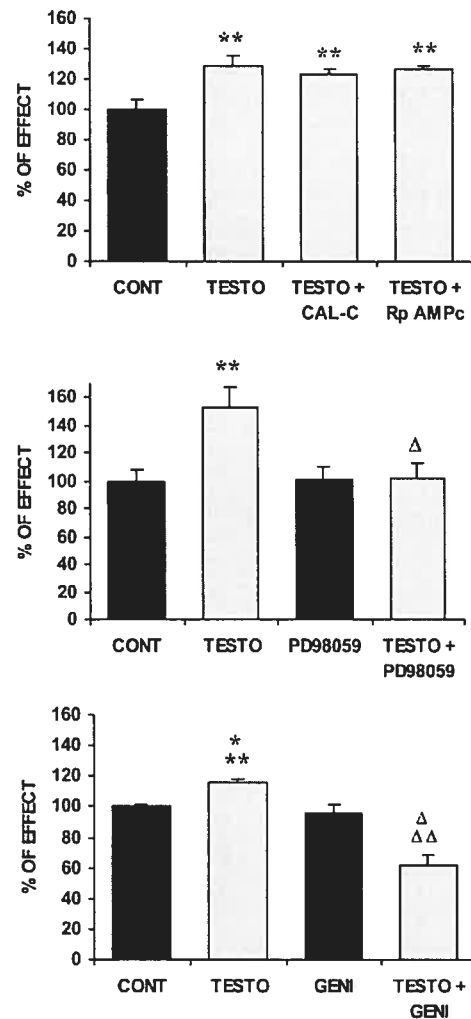


Fig. 6. Effect of intracellular messengers inhibitors, Rp cAMP, calphostin, PD 98059 and genistein on the testosterone dependent  $\text{Ca}^{2+}$  transport by the distal luminal membrane. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.02$ , \*\*\* $P < 0.01$  compared to the control values,  $n = 5$ .

Table 3

Effect of  $\text{Ca}^{2+}$  channel inhibitors on testosterone dependent 0.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  uptake (pmol/ $\mu\text{g}/10\text{ s}$ )

	Membranes from untreated tubule	Membranes from testosterone treated tubule
Control	0.60 $\pm$ 0.02	0.88 $\pm$ 0.045 <sup>a</sup>
Diltiazem ( $n = 3$ )	0.52 $\pm$ 0.03	0.91 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>
Control	1.28 $\pm$ 0.12	1.74 $\pm$ 0.17 <sup>b</sup>
$\omega$ -Conotoxin ( $n = 9$ )	1.14 $\pm$ 0.07	1.49 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>
Control	1.06 $\pm$ 0.05	1.32 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>
Mibefradil ( $n = 7$ )	0.94 $\pm$ 0.03	0.84 $\pm$ 0.12 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>  $P < 0.01$  compared to the values of membranes from control tubules.<sup>b</sup>  $P < 0.02$  compared to the values of membranes from control tubules.<sup>c</sup>  $P < 0.01$  compared to the values of membranes from testosterone treated tubules. Data are mean  $\pm$  S.E.M.

of testosterone. However, addition of either  $10^{-6}$  M PD 98059 or  $10^{-6}$  M genistein to the incubation medium completely abolished the effect of testosterone upon  $\text{Ca}^{2+}$  uptake (Fig. 6b and c).

To confirm the implication of a MEK kinase and a tyrosine kinase, we studied the effect of U0 126 (another anti-MEK kinase) and AG 99 (another anti-tyrosine kinase). In this new series of experiments, 0.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  uptakes were  $0.98 \pm 0.09$ ,  $1.42 \pm 0.06$  ( $P < 0.02$ ) and  $1.00 \pm 0.07$  pmol/( $\mu\text{g}$  10 s) ( $n = 3$ ) by membranes from control, testosterone treated and testosterone treated tubules in the presence of  $10^{-5}$  M U0 126. The inhibitor completely reversed the effect of testosterone. A similar inhibition was observed with  $10^{-5}$  M AG 99. Indeed, 0.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  uptakes were  $0.95 \pm 0.07$ ,  $1.30 \pm 0.10$  ( $P < 0.05$ ) and  $0.90 \pm 0.02$  pmol/( $\mu\text{g}$  10 s) ( $n = 3$ ) by membranes from control, testosterone treated and testosterone treated tubules in the presence of AG 99. All of these results demonstrate that the mechanisms involved in the hormone action implies activation of the tandem MEK kinase/tyrosine kinase.

### 3.8. Which type of $\text{Ca}^{2+}$ channel is targeted by the hormone?

In an attempt to define the type of channels involved in the testosterone action, a new series of  $\text{Ca}^{2+}$  uptake experiments was performed using different channel inhibitors in the incubation medium: 0.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  transport was not influenced by the presence of 50  $\mu\text{M}$  diltiazem (the L-type channel inhibitor), nor by  $10^{-7}$  M  $\omega$ -conotoxin MVIIC (the P/Q-type channel inhibitor). In contrast,  $10^{-6}$  M mibefradil (the T-type channel inhibitor), completely abolished the hormonal effect (Fig. 7, Table 3).

### 3.9. Effect of testosterone on $\text{Na}^+$ transport by proximal and distal tubules

$\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^+$  transport by the distal luminal membranes are tightly related and most of the  $\text{Ca}^{2+}$  regulating hormones, except aldosterone, (Leclerc et al., 2004) influence

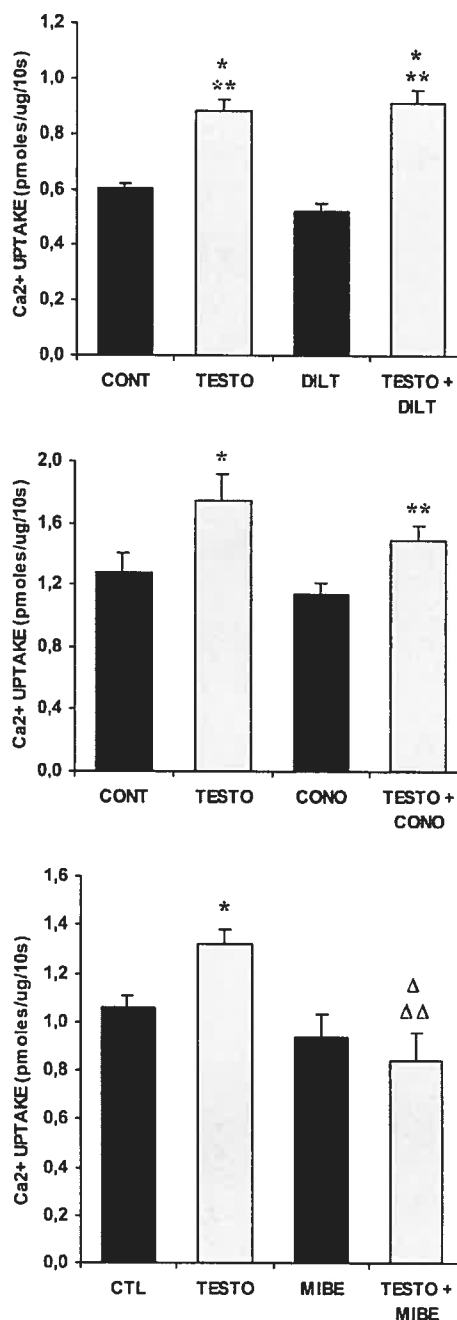


Fig. 7. Effect of  $10^{-10}$  M testosterone on 0.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by the distal luminal membranes in the absence and presence of 50  $\mu\text{M}$  diltiazem ( $n = 3$ ), 100 nM  $\omega$ -conotoxin MVIIC ( $n = 9$ ) and  $10^{-6}$  M mibefradil ( $n = 7$ ). \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.01$  compared to control values.  $\Delta\Delta$   $P < 0.02$ ,  $\Delta\Delta\Delta$   $P < 0.01$  compared to the values obtained with membranes from treated tubules.

both cations in opposite directions. However, in the proximal tubule, when receptors are present, this general rule is less evident. For instance, angiotensin II has been shown to enhance both  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^+$  uptake by the proximal membranes. Therefore, we tested the action of testosterone on  $\text{Na}^+$  transport by proximal and distal membranes. The tubule

suspensions were incubated for 5 min with  $10^{-10}$  M of the hormone and the 1 mM  $\text{Na}^+$  uptake was measured by their respective luminal membranes. Unexpectedly, testosterone decreased  $\text{Na}^+$  transport by the vesicles of both origins: i.e. from  $0.40 \pm 0.01$  to  $0.34 \pm 0.01$  pmol/( $\mu\text{g}$  10 s) ( $P < 0.02$ ,  $n = 4$ ) in the proximal membranes and from  $0.69 \pm 0.02$  to  $0.37 \pm 0.05$  pmol/( $\mu\text{g}$  10 s) ( $P < 0.01$ ,  $n = 3$ ) in the distal membranes.

#### 4. Discussion

##### 4.1. Is there an effect of testosterone on $\text{Ca}^{2+}$ uptake by proximal tubule cells ?

The proximal tubule expresses receptors for testosterone, as shown by its effect on  $\text{Na}^+$  transport and by other reported experiments. The hormone, for instance, has been shown to stimulate 25-hydroxy vitamin  $\text{D}_3$  1 $\alpha$ -hydroxylase in the chicken (Tanaka et al., 1978) and guinea pig (Hagenfeldt et al., 1989), to influence the dimorphism of mitochondria and liposomes in mouse kidney proximal tubules (Koenig et al., 1980), to regulate the protein promoter (Ding et al., 1997) and therefore increase angiotensinogen RNA (Ellison et al., 1989), and to enhance oxalate stone formation in rats (Lee et al., 1992, 1996), a phenomenon which might be at the origin of the predominantly male incidence of urolithiasis (Fan and Glass, 1998; Fan et al., 1999). It is therefore likely that the lack of the hormone influence on  $\text{Ca}^{2+}$  transport in this segment is due to an absence of either intracellular specific messengers or an absence of appropriate  $\text{Ca}^{2+}$  channels in the brush border membranes.

##### 4.2. Testosterone enhances $\text{Ca}^{2+}$ transport by the distal luminal membrane: new information

We recently reported that incubation of distal tubules with estrogen results in a decrease in  $\text{Ca}^{2+}$  transport by their luminal membranes (Brunette and Leclerc, 2001). We now observe an opposite effect of testosterone. Koh et al. (1996) previously showed that in ovariectomized female and orchietomized male rats (i.e. in *in vivo* experiments), testosterone treatment produces hypocalcemia and hypocalciuria. The exact cause of hypocalcemia, however, was not clearly demonstrated. Hypothetically, this decrease in calcemia could be attributed to bone fixation, resulting in a stimulation of PTH secretion and secondary hypocalciuria. But a direct stimulation of  $\text{Ca}^{2+}$  reabsorption might have also contributed to the observed hypocalciuria. In *in vitro* experiments performed in mouse kidney cortex treated with testosterone, Goldstone et al. (1982, 1983) reported an early stimulation of endocytosis as well as hexose, amino acid and  $\text{Ca}^{2+}$  transports. However, the mouse kidney slices contained both proximal and distal tubules, and therefore these experiments failed to determine precisely the site of  $\text{Ca}^{2+}$

fluxes. Fan et al. (1999) reported an increase in  $\text{Ca}^{2+}$  excretion in castrated rats given testosterone, an effect that the authors attributed to hyperoxaluria. Finally, Dick et al. (2003) observed in immortalized distal tubule kidney cells, an increase in plasma  $\text{Ca}^{2+}$  pump following a treatment with androgen. Whether such an increase in the pump is primary or secondary to  $\text{Ca}^{2+}$  influx remains to be determined. The present experiments allow one to evaluate the direct effect of testosterone on calcium reabsorption by the luminal membrane, independent of any other factor.

##### 4.3. Does testosterone influence $\text{Ca}^{2+}$ transport according to a non-genomic mechanism ?

Traditionally, steroid hormones act through modulation of nuclear transcription, a process which takes time. However, during the past few years, evidence for steroid membrane receptors has been described in several types of cells. Aldosterone, for example, has been shown to enhance  $\text{Na}^+$  transport in rat vascular smooth muscle cells (Christ et al., 1995) and progesterone to influence sexual organs in the hamster (DeBold and Frye, 1994) through non-genomic actions.

Testosterone has also been shown to induce  $\text{Ca}^{2+}$  influx via non-genomic surface receptors in a variety of cells. Lieberherr and Grosse (1994) reported in rat osteoblasts a rapid stimulation of  $\text{Ca}_i$ , a stimulation which was inhibited by  $\text{Ca}^{2+}$  channel blockers. In Sertoli cells, a similar effect of the hormone was also reported, even when conjugated with BSA, therefore reflecting a membrane mechanism (Gorczyńska and Handelsman, 1995). Finally, T cells (Benten et al., 1997; Wunderlich et al., 2002) and prostate cancer cells (Papakonstanti et al., 2003) also possess surface receptors to testosterone, coupled to G proteins and able to induce activation of enzymes such as protein kinases and phospholipases.

In exceptional cases, however, steroid hormones directly open  $\text{Ca}^{2+}$  channels in membrane vesicles, i.e. membranes separated from the rest of the cell. Indeed, we recently reported such an effect of progesterone on  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by distal luminal membrane vesicles (Brunette and Leclerc, 2002). The present results do not support a similar mechanism for testosterone. Therefore, it is still probable that the relatively rapid effect of testosterone on  $\text{Ca}^{2+}$  transport by the kidney requires the presence of the cytosol, independently of any genomic mechanism.

##### 4.4. The intracellular signaling pathways involved in the non-genomic action of testosterone

Neither Rp-cAMP nor calphostin C had any influence upon the testosterone sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  channels. It appears, therefore, that these channels differ from those regulated by parathyroid hormone and calcitonin in the kidney, and also differ from those regulated by testosterone in osteoblasts (Lieberherr and Grosse, 1994). Interestingly, PD 98059,

genistein, U0 126 and AG 99, all prevented the hormone action on  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by the distal luminal membranes, suggesting that tyrosine kinase phosphorylation and subsequent activation of a MEK kinase signaling pathway are key steps to initiate the channel response.

Such a mechanism has previously been described in primary cultures of Sertoli cells (abstract; Walker and Fix, XVII North American Testis Workshop, Phoenix, AR, 2003).

#### 4.5. Dose–response curve and the plasma concentrations of testosterone

Serum testosterone levels are age-related. Beginning in the third decade, aging is associated with a progressive decline in serum levels. Approximately 98% of the circulating testosterone is bound to serum proteins, predominantly to sex hormone binding globulin.

Our dose–response curve shows a peak-action at  $10^{-10}$  and  $10^{-11}$  M free testosterone, values which are very close to those which activate  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in human prostatic cell lines and Sertoli cell cultures (Lyng et al., 2000). In the human, Ferrini and Barrett-Connor (1998) and Harman et al. (2001) observed a total serum concentration decreasing from approximately 25 to 15 nM between the ages of 30 and 80 years. Since about 98–99% of this hormone is bound to proteins, free testosterone levels available for physiologic tasks varies from  $10^{-11}$  to  $10^{-10}$  M, i.e. values which exactly correspond to our in vitro dose–response curve.

#### 4.6. Testosterone enhances a low affinity $\text{Ca}^{2+}$ channel in the kidney, which belongs to the T-type

Previous studies, using several techniques, such as  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by membrane vesicles (Brunette et al., 1992; Lajeunesse et al., 1994) electrophysiology (Peng et al., 2000; Suzuki et al., 2000; Peng and Hediger, 2002) or molecular biology (Barry et al., 1998; Peng et al., 2000) (abstract; Ohki et al. Am. Soc. Nephrol. Annual Meeting, San Francisco, 2001, A3955) reported the presence of at least two types of  $\text{Ca}^{2+}$  channel in the distal luminal membranes. The present data shows that testosterone, like calcitonin (Zuo et al., 1997) targets some low affinity  $\text{Ca}^{2+}$  channels in the kidney, whose nature is now precised using specific inhibitors.

$\text{Ca}^{2+}$  channels sensitive to testosterone have been detected in several types of tissues, with multiple effects: testosterone opens some L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in osteosarcoma cells (Takeuchi and Guggino, 1996) decreases  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by coronary smooth muscles (Murphy and Khali, 1999; English et al., 2002) and ventricular myocytes (Gupte et al., 2002), both effects being also attributed to L-type channels. In rats treated with norepinephrine,  $5\alpha$  and  $5\alpha$ -dihydrotestosterone produced biphasic, dose-dependent vasodepressor responses (Perusquia and Villalon, 2002). These experiments again suggest a blockade of voltage operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels by testosterone. However, our experiments failed to detect any

action of testosterone on L-type channels despite of the presence of such channels in our distal luminal membrane vesicles. In contrast,  $10^{-6}$  M mibefradil completely abolished the effect of testosterone on  $0.5$  mM  $\text{Ca}^{2+}$  uptake suggesting that the targeted channel belongs to a T-type. T-type channels represent an heterogeneous pool of channels which have been predominantly described in the central nervous system, retina, peripheral nervous system, cardiac myocytes, vascular endothelial cells, osteoblasts, branchi smooth muscles, pancreatic islets, spermatozoa and ovarian granulosa cells (cf. review by Yunker and McEnery, 2003). In the kidney, Andreasen et al. (2000) reported a RT-PCR analysis of microdissected rat nephron segments, which revealed the presence of T channels in the distal convoluted tubule, the connecting tubule and the cortical collecting duct. It is therefore probable that the action of testosterone which involved a low affinity  $\text{Ca}^{2+}$  channel is localized in the late part of the distal nephron whose tubular fluid  $\text{Ca}^{2+}$  content is relatively high, compared to that of the early segments. These new data confirm the fact that distal luminal membranes are the site of several types of  $\text{Ca}^{2+}$  channel, each of them being regulated differently.

#### 4.7. Testosterone decreases $\text{Na}^{+}$ transport by the proximal and distal membranes

The finding of a decreased in  $\text{Na}^{+}$  reabsorption by the proximal tubule membranes was totally unexpected since not only such an effect has never been reported, but previous studies showed the contrary. Indeed, Ouar et al. (1998) observed in cultured immortalized proximal tubule cells from mice (transgenic mice carrying the L-pyruvate kinase/SV40 hybride gene) an increased formation of domes following incubation with dihydrotestosterone, suggesting an increase rather than a decrease in  $\text{Na}^{+}$  reabsorption. We have no evident explanation for this apparent discrepancy, except that in the latter experiments, the hormone stimulated the incorporation of  $^3\text{H}$  thymidine, suggesting a proliferation of cells, possibly responsible for a global increase in transport.

In the distal tubule membranes, most of the hormone influences on  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^{+}$  reabsorption act in opposite direction. Parathyroid hormone, calcitonine, progesterone and angiotensin for example enhance  $\text{Ca}^{2+}$  and decrease  $\text{Na}^{+}$  uptakes, whereas estrogen does the inverse (Brunette et al., 2001). Testosterone follows the general rule. This observation however does not necessarily indicate that these hormonal sensitive channels are the same, and are permeable to both cations. Hypothetically, these hormones may target separately  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^{+}$  channels (or  $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$  exchanger) even in the same tubule cells or in different cells of the same segments or different segments of the distal tubule. Alternatively, it is possible that testosterone as other hormones, influences a non-specific cation channel, through which  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^{+}$  are competitively transported. If the action of the hormone on  $\text{Na}^{+}$  occurs in the loop of Henle or in a early segment of the distal convoluted tubule, we can

hypothesize that an increase in  $\text{Na}^+$  delivery in the distal nephron segments results in some inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$  reabsorption, as shown in *in vitro* experiments (Brunette et al., 1992), which might explain the apparent discrepancy between the present *in vitro* results and some *in vivo* observations as those reported by Robertson et al. (1980) and Lee et al. (1992, 1996). Furthermore, these authors observed in castrated rats given testosterone, a strong increase in excretion of oxalate citrate. It is therefore probable that testosterone, by increasing oxalate citrate on one hand and  $\text{Na}^+$  excretion on the other hand, contributes directly (with oxalate) and indirectly (with  $\text{Na}^+$  and therefore  $\text{Ca}^{2+}$ ) to urinary lithiasis.

#### 4.8. Conclusion

Our *in vitro* experiments show that testosterone enhances  $\text{Ca}^{2+}$  reabsorption by the distal tubule through a non-genomic stimulation of a tyrosine kinase and a MEK kinase, and opening of a T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel in the luminal membranes.

#### Acknowledgements

The authors are grateful to Jean-Marie Bélanger for kindly providing the rabbit kidneys and to Claudette Plante for her secretarial assistance. This study was supported by grants from the Medical Research Council of Canada (MT 11307).

#### References

- Altschule, M.D., Tillotson, K.J., 1948. The use of testosterone in the treatment of depression. *New Engl. J. Med.* 29, 1036–1038.
- Andreasen, D., Jensen, B.L., Hansen, P.B., Kwon, T.H., Nielsen, S., Skott, O., 2000. The alpha (1G)-subunit of a voltage-dependent ( $\text{Ca}^{2+}$ ) channel is localized in the rat distal nephron and collecting duct. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 279, F997–F1005.
- Arver, S., Dobs, A.S., Meikle, A.W., Allen, R.P., Sanders, S.W., Mazer, N.A., 1996. Improvement of sexual function in testosterone deficient men treated for 1 year with a permeation enhanced testosterone transdermal system. *J. Urol.* 155 (5), 1604–1608.
- Barrett-Connor, E., Von Muhlen, D.G., Kritiz-Silverstein, D., 1999. Bioavailable testosterone and depressed mood in older men: the Rancho Bernardo Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 573–577.
- Barry, E.L., Gesek, F.A., Yu, A.S., Lytton, J., Friedman, P.A., 1998. Distinct calcium channel isoforms mediate parathyroid hormone and chlorothiazide-stimulated calcium entry in transporting epithelial cells. *J. Membr. Biol.* 161, 55–64.
- Behre, H.M., Simoni, M., Nieschlag, E., 1997a. Strong association between serum levels of leptin and testosterone in men. *Clin. Endocrinol.* 47, 237–240.
- Behre, H.M., Kliesch, S., Link, T.M., Nieschlag, E., 1997b. Long-term effect of testosterone therapy on bone mineral density in hypogonadal men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 2386–2390.
- Benten, W.P., Lieberherr, M., Sekeris, C.E., Wunderlich, F., 1997. Testosterone induces  $\text{Ca}^{2+}$  influx via non-genomic surface receptors in activated T cells. *FEBS Lett.* 407, 211–214.
- Berger, F.G., Loose, D., Meisner, H., Watson, G., 1986. Androgen induction of messenger RNA concentrations in mouse kidney is posttranscriptional. *Biochemistry* 25, 1170–1175.
- Bhasin, S., Storer, T.W., Berman, N., Yarasheski, K.E., Clevenger, B., Phillips, S., Lee, W.P., Bunnell, T.J., Casaburi, R., 1997. Testosterone replacement increases fat-free mass and muscle size in hypogonadal men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 407–413.
- Brunette, M.G., Mailloux, J., Lajeunesse, D., 1992. Calcium transport through the luminal membrane of the distal tubule I. Interrelationship with sodium. *Kidney Int.* 41, 281–288.
- Brunette, M.G., Leclerc, M., 2001. Effect of estrogen on calcium and sodium transport by the nephron luminal membranes. *J. Endocrinol.* 170, 441–450.
- Brunette, M.G., Leclerc, M., 2002. Renal action of progesterone: effect on calcium reabsorption. *Mol. Cell. Endocrinol.* 194, 183–190.
- Christ, M., Douwes, K., Eisen, C., Bechtner, G., Wehling, M., 1995. Rapid effects of aldosterone on sodium transport in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 25, 117–123.
- Corrales, J.J., Pastor, I., Garcia, L.C., Montero, J.J., deCastro, S., Miralles, J.M., 1985. Androgen receptors content in cytosol from non-tumoral human kidney and its relation to steroid hormone environment. *Urol. Int.* 40, 307–313.
- DeBold, J.F., Frye, C.A., 1994. Genomic and non-genomic actions of progesterone in the control of female hamster sexual behavior. *Horm. Behav.* 28, 445–453.
- Dick, I.M., Liu, J., Glendenning, P., Prince, R.L., 2003. Estrogen and androgen regulation of plasma membrane calcium pump activity in immortalized distal tubule kidney cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 212, 11–18.
- Ding, Y., Davison, R.L., Hardy, D.O., Zhu, L.J., Merrill, D.C., 1997. The kidney androgen-regulated protein promoter confers renal proximal tubule cell-specific and highly androgen-responsive expression on the human angiotensinogen gene in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 272, 28142–28148.
- Ellison, K.E., Ingelfinger, J.R., Pivor, M., Dzau, V.J., 1989. Androgen regulation of rat renal angiotensinogen messenger RNA expression. *J. Clin. Invest.* 83, 1941–1945.
- English, K.M., Jones, R.D., Morice, A.H., Channer, K.S., 2002. Testosterone acts as a coronary vasodilator by a calcium antagonistic action. *J. Endocrinol. Invest.* 25, 455–458.
- Fan, J., Glass, M.A., 1998. Effect of castration and finasteride on urinary oxalate excretion in male rats. *Urol. Res.* 26, 71–75.
- Fan, J., Chandhoke, P.S., Gramsas, S.A., 1999. Role of sex hormones in experimental calcium oxalate nephrolithiasis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10 (Suppl. 14), S376–S380.
- Feldman, H.A., Goldstein, I., Hatzichristou, D.G., Krane, R.J., McKinlay, J.B., 1994. Impotence and its medical and psychosocial correlates: results of the Massachusetts Male Aging Study. *J. Urol.* 151, 54–61.
- Ferrini, R.L., Barrett-Connor, E., 1998. Sex hormones and age: a cross-sectional study of testosterone and estradiol and their bioavailable fraction in community-dwelling men. *Am. J. Epidemiol.* 147, 750–754.
- Goldstone, A.D., Koenig, H., Lu, C.Y., 1982. Testosterone dependent sexual dimorphism of the mouse kidney is mediated by polyamin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 104, 165–172.
- Goldstone, A.D., Koenig, H., Luc, C.C.Y., 1983. Androgenic stimulation of endocytosis, amino acid and hexose transport in mouse kidney cortex involves increases calcium fluxes. *Biochim. Biophys. Acta* 762, 366–371.
- Gorczyńska, E., Handelsman, D.J., 1995. Androgens rapidly increase the cytosolic calcium concentration in Sertoli cells. *Endocrinology* 136, 2052–2059.
- Gupte, S.A., Tateyama, M., Okada, T., Oka, M., Ochi, R., 2002. Epiandrosterone, a metabolite of testosterone precursor, blocks L-type calcium channels of ventricular myocytes and inhibits myocardial contractility. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 34, 679–688.
- Hagenfeldt, Y., Eriksson, H., Bjorkhen, R., 1989. Stimulatory effect of testosterone on renal 25-hydroxyvitamin D-3,1 alpha-hydroxylase in guinea pig. *Biochim. Biophys. Acta* 1002, 84–88.

- Harman, S., Metter, J., Tobin, J.D., Pearson, J., Blackman, M.R., 2001. Longitudinal effects of aging on serum total and free testosterone levels. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 724–731.
- Herzberg, M.H., Goudsmit, E., Kruisbrink, J., Boer, G.J., 1989. Testosterone treatment restores reduced vasopressin-binding sites in the kidney of the aging rat. *J. Endocrinol.* 123, 59–63.
- Hislop, M.S., Ratanjee, B.D., Soule, S.G., Marais, A.D., 1999. Effects of anabolic-androgenic steroid use or gonadal testosterone suppression on serum leptin concentration in men. *Eur. J. Endocrinol.* 141, 40–46.
- Huntson, D.L., 1975. Two techniques for evaluating small molecule-macro molecule binding in complex system. *Anal. Biochem.* 63, 99–109.
- Kaiser, F.E., Viosca, S.P., Morley, J.E., Mooradian, A.D., Davis, S.S., Korenman, S.G., 1988. Impotence and aging: clinical and hormonal factors. *J. Am. Geriatr. Soc.* 36, 511–519.
- Katznelson, L., Finkelstein, J.S., Schoenfeld, D.A., Rosenthal, D.L., Anderson, E.J., Klibanski, A., 1996. Increase in bone density and lean body mass during testosterone administration in men with acquired hypogonadism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81, 4358–4365.
- Kelly, M.H., Hamilton, J.R., 1970. A micro-technique for the assay of intestinal alkaline phosphatase. Results in normal children and in children with celiac disease. *Clin. Biochem.* 3, 33–43.
- Koenig, H., Goldstone, A., Blume, G., Lu, C.Y., 1980. Testosterone-mediated sexual dimorphism of mitochondria and lysosomes in mouse kidney proximal tubules. *Science* 209, 1023–1026.
- Koenig, H., Goldstone, A., Lu, C.Y., 1982. Testosterone induces a rapid stimulation of endocytosis, amino acid and hexose transport in mouse kidney cortex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 106, 346–353.
- Koh, E.T., Owen, W.L., Om, A.S., 1996. Exogenous oestrogen affects calcium metabolism differently from exogenous testosterone in ovariectomized or orchietomized rats fed a high fructose diet severely deficient in magnesium. *Magn. Res.* 9, 23–31.
- Lajeunesse, D., Bouhria, I., Brunette, M.G., 1994. Parathyroid hormone and hydrochlorothiazide increase calcium transport by the luminal membrane of rabbit distal nephron segments through different pathways. *Endocrinology* 134, 35–41.
- Leclerc, M., Couchourel, D., Brunette, M.G., 2004. Aldosterone enhances renal calcium reabsorption by two types of channels. *Kidney Int.* 66 (1–10).
- Lee, Y.H., Huang, W.C., Chiang, H., Chen, M.T., Huang, J.K., Chang, K.L.S., 1992. Determinant role of testosterone in the pathogenesis of urolithiasis in rats. *J. Urol.* 147, 1134–1138.
- Lee, Y.H., Huang, W.C., Huang, J.K., Chang, L.S., 1996. Testosterone enhances whereas estrogen inhibits calcium oxalate stone formation in ethylene glycol treated rats. *J. Urol.* 156, 502–505.
- Leifke, E., Korner, H.C., Kink, T.M., Behre, H.M., Peters, P.E., Nieschla, G.E., 1998. Effects of testosterone replacement therapy on cortical and trabecular bone mineral density, vertebral body area and paraspinal muscle area in hypogonadal men. *Eur. J. Endocrinol.* 138, 51–58.
- Levitt, A.J., Joffe, R.T., 1988. Total and free testosterone in depressed men. *Acta Psychiatr. Scand.* 77, 346–348.
- Lieberherr, M., Grosse, B., 1994. Androgens increase intracellular calcium concentration and inositol 1,4,5-trisphosphate and diacylglycerol formation via a pertussis toxin-sensitive G-protein. *J. Biol. Chem.* 269, 7217–7223.
- Lyng, F.M., Jones, G.R., Rommerts, F.F.G., 2000. Rapid androgen actions on calcium signaling in rat sertoli cells and two human prostatic cell lines: similar biphasic responses between 1 picomolar and 100 nanomolar concentrations. *Biol. Reprod.* 63, 736–747.
- Moffat, S.D., Zonderman, A.B., Metter, E.J., Blackman, M.R., Harman, S.M., Resnick, S.M., 2002. Longitudinal assessment of serum free testosterone concentration predicts memory performance and cognitive status in elderly men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 5001–5007.
- Monga, M., Kostelec, M., Kamarei, M., 2002. Patient satisfaction with testosterone supplementation for the treatment of erectile dysfunction. *Arch. Androl.* 48, 433–442.
- Murphy, J.G., Khali, R.A., 1999. Decreased  $[Ca^{2+}]_i$  during inhibition of coronary smooth muscle contraction by 17 $\beta$ -estradiol, progesterone, and testosterone. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 29, 44–52.
- Okun, M.S., Walter, B.L., McDonald, W.M., Tenover, J.L., Green, J., Juncos, J.L., DeLong, M.R., 2002. Beneficial effects of testosterone replacement for the nonmotor symptoms of Parkinson disease. *Arch. Neurol.* 59, 1750–1753.
- Ouar, Z., Sole, S., Bens, M., Rafestin-Oblin, M.E., Meseguer, A., Vandewalle, A., 1998. Pleiotropic effects of dihydrotestosterone in immortalized mouse proximal tubule cells. Technical note. *Kidney Int.* 53, 59–66.
- Oudar, O., Elaer, M., Bankir, L., Ganten, D., Ganten, U., Kriz, W., 1991. Differences in rat kidney morphology between males, females and testosterone-treated females. *Ren. Physiol. Biochem.* 14, 92–102.
- Papakonstanti, E.A., Kampa, M., Castanas, E., Stournaras, C., 2003. A rapid, nongenomic, signaling pathway regulates the actin reorganization induced by activation of membrane testosterone receptors. *Mol. Endocrinol.* 17, 870–881.
- Pavo, I., Varga, C., Szucs, M., Gardi, J., Laszlo, F.A., 1995. Effects of testosterone on the rat renal medullary vasopressin receptor concentration and the antidiuretic response. *Life Sci.* 56, 1215–1222.
- Peng, J.B., Chen, X.Z., Berger, U.V., Vassilev, P.M., Brown, E.M., Hediger, M.A., 2000. A rat kidney-specific calcium transporter in the distal nephron. *J. Biol. Chem.* 275, 28186–28194.
- Peng, J.B., Hediger, M.A., 2002. A family of calcium-permeable channels in the kidney: distinct roles in renal calcium handling. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 11, 555–561.
- Perusquia, M., Villalon, C.M., 2002. The vasodepressor effect of androgens in pithed rats: potential role of calcium channels. *Steroids* 67, 1021–1028.
- Pope Jr., H.G., Cohane, G.H., Hanayama, G., Siegel, A.J., Hudson, J.L., 2003. Testosterone gel supplementation for men with refractory depression: a randomized, placebo-controlled trial. *Am. J. Psychiatr.* 160, 105–111.
- Post, R.S., Sen, A.K., 1967. Sodium and potassium stimulated ATPase. *Methods Enzymol.* 10, 762–768.
- Robertson, W.G., Peacock, M., Heyburn, P.J., Hanes, F.A., 1980. Epidemiological risk factors in calcium stone disease. *Scand. J. Urol. Nephrol. Suppl.* 53, 15–30.
- Rolf, C., von Eckardstein, S., Koken, U., Nieschlag, E., 2002. Testosterone substitution of hypogonadal men prevents the age-dependent increases in body mass index, body fat and leptin seen in healthy aging men: results of a cross-sectional study. *Eur. J. Endocrinol.* 146, 505–511.
- Seidman, S.N., Spatz, E., Rizzo, C., Rosse, S.P., 2001. Testosterone replacement therapy for hypogonadal men with major depressive disorder: a randomized, placebo-controlled clinical trial. *J. Clin. Psychiatr.* 62, 406–412.
- Shabsigh, R., 1997. The effects of testosterone on the cavernous tissue and erectile function. *World J. Urol.* 15, 21–26.
- Suzuki, M., Ishibashi, K., Ooki, G., Tsuruoka, S., Imai, M., 2000. Electrophysiologic characteristics of the Ca-permeable channels, ECaC and CaT, in the kidney. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 274, 344–349.
- Takeuchi, K., Guggino, S.E., 1996. 24R,25-(OH) $_2$  vitamin D $_3$  inhibits 1 $\alpha$ ,25-(OH) $_2$  vitamin D $_3$  and testosterone potentiation of calcium channels in osteosarcoma cells. *J. Biol. Chem.* 271, 33335–33343.
- Tanaka, Y., Castillo, L., Wineland, M.J., de Luca, H.F., 1978. Synergistic effect of progesterone, testosterone, and estradiol in the stimulation of chick renal 25-hydroxyvitamin D $_3$ -1 $\alpha$ -hydroxylase. *Endocrinology* 103, 2035–2039.
- Tenover, J.S., 1992. Effects of testosterone supplementation in the aging male. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 75, 1092–1098.
- Vastag, B., 2003. Many questions, few answers for testosterone replacement therapy. *JAMA* 289, 971–972.
- Vermeulen, A., 1991. Clinical review 24: androgens in the aging male. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 73, 221–224.
- Vermeulen, A., Goemaere, S., Kayfman, J.M., 1999. Testosterone, body composition and aging. *J. Endocrinol. Invest.* 22, 110–116.

- Wang, C., Alexander, G., Berman, N., Salehian, B., Davidson, T., McDonald, V., Steiner, B., Hull, L., Callegari, C., Swerdloff, R.S., 1996. Testosterone replacement therapy improves mood in hypogonadal men: a clinical research center study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81, 3578–3583.
- Wang, C., Swerdloff, R.S., Iranmanesh, A., Dobs, A., Snyder, P.J., Cunningham, G., Matsumoto, A.M., Weber, T., Berman, N., 2000. Transdermal testosterone gel improves sexual function, mood, muscle strength, and body composition parameters in hypogonadal men. Testosterone Gel Study Group. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 2839–2853.
- Wunderlich, F., Benten, W.P., Lieberherr, M., Guo, Z., Stamm, O., Wrehlke, C., Sekeris, C.E., Mossmann, H., 2002. Testosterone signaling in T cells and macrophages. *Steroids* 67, 535–538.
- Yunker, A.M.R., McEnery, M.W., 2003. Low voltage activated (T-type) calcium channels in review. *J. Bioenerg. Biomembr.* 35, 533–575.
- Zuo, Q., Claveau, D., Hilal, G., Leclerc, M., Brunette, M.G., 1997. Effect of calcitonin on calcium transport by the luminal and basolateral membranes of the rabbit nephron. *Kidney Int.* 51, 1991–1999.

# Characterization of three types of calcium channel in the luminal membrane of the distal nephron

M.G. Brunette, M. Leclerc, D. Couchourel, J. Mailloux, and Y. Bourgeois

**Abstract:** We previously reported a dual kinetics of  $\text{Ca}^{2+}$  transport by the distal tubule luminal membrane of the kidney, suggesting the presence of several types of channels. To better characterize these channels, we examined the effects of specific inhibitors (i.e., diltiazem, an L-type channel;  $\omega$ -conotoxin MVIIC, a P/Q-type channel; and mibefradil, a T-type channel antagonist) on 0.1 and 0.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by rabbit nephron luminal membranes. None of these inhibitors influenced  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by the proximal tubule membranes. In contrast, in the absence of sodium ( $\text{Na}^+$ ), the three channel antagonists decreased  $\text{Ca}^{2+}$  transport by the distal membranes, and their action depended on the substrate concentrations: 50  $\mu\text{M}$  diltiazem decreased 0.1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  uptake from  $0.65 \pm 0.07$  to  $0.48 \pm 0.06$   $\text{pmol} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot 10^{-1} \text{ s}^{-1}$  ( $P < 0.05$ ) without influencing 0.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  transport, whereas 100 nM  $\omega$ -conotoxin MVIIC decreased 0.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  uptake from  $1.02 \pm 0.05$  to  $0.90 \pm 0.05$   $\text{pmol} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot 10^{-1} \text{ s}^{-1}$  ( $P < 0.02$ ) and 1  $\mu\text{M}$  mibefradil decreased it from  $1.13 \pm 0.09$  to  $0.94 \pm 0.09$   $\text{pmol} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot 10^{-1} \text{ s}^{-1}$  ( $P < 0.05$ ); the latter two inhibitors left 0.1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  transport unchanged. Diltiazem decreased the  $V_{\text{max}}$  of the high-affinity channels, whereas  $\omega$ -conotoxin MVIIC and mibefradil influenced exclusively the  $V_{\text{max}}$  of the low-affinity channels. These results not only confirm that the distal luminal membrane is the site of  $\text{Ca}^{2+}$  channels, but they suggest that these channels belong to the L, P/Q, and T types.

**Key words:** renal calcium transport, calcium channels, diltiazem, mibefradil,  $\omega$ -conotoxin.

**Résumé :** Nous avons déjà fait état d'une cinétique double du transport du calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) par la membrane luminale du tubule distal du rein, ce qui nous a conduit à penser à la présence de plusieurs types de canaux. Pour mieux caractériser ces canaux, nous avons examiné les effets d'inhibiteurs spécifiques, soit le diltiazem, un canal de type L, la  $\omega$ -conotoxine MVIIC, un canal de type P/Q, et le mibéfradil, un antagoniste du canal de type T, sur les captures de  $\text{Ca}^{2+}$  0,1 et 0,5 mM par les membranes luminales du néphron de lapin. Aucun de ces inhibiteurs n'a influé sur la capture de  $\text{Ca}^{2+}$  par les membranes du tubule proximal. À l'opposé, en l'absence de sodium ( $\text{Na}^+$ ), les trois antagonistes ont diminué le transport de  $\text{Ca}^{2+}$  par les membranes distales, et leur action a été dépendante des concentrations des substrats : 50  $\mu\text{M}$  de diltiazem ont diminué la capture de  $\text{Ca}^{2+}$  0,1 mM de  $0,65 \pm 0,07$  à  $0,48 \pm 0,06$   $\text{pmol} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot 10^{-1} \text{ s}^{-1}$  ( $P < 0,05$ ) sans influencer sur le transport de  $\text{Ca}^{2+}$  0,5 mM, alors que 100 nM de  $\omega$ -conotoxine MVIIC ont diminué la capture de  $\text{Ca}^{2+}$  0,5 mM de  $1,02 \pm 0,05$  à  $0,90 \pm 0,05$   $\text{pmol} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot 10^{-1} \text{ s}^{-1}$  ( $P < 0,02$ ) et 1  $\mu\text{M}$  de mibéfradil, de  $1,13 \pm 0,09$  à  $0,94 \pm 0,09$   $\text{pmol} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot 10^{-1} \text{ s}^{-1}$  ( $P < 0,05$ ); toutefois, ces deux inhibiteurs n'ont pas modifié le transport de  $\text{Ca}^{2+}$  0,1 mM. Le diltiazem a diminué la  $V_{\text{max}}$  des canaux de haute affinité, alors que la  $\omega$ -conotoxine MVIIC et le mibéfradil n'ont influé que sur la  $V_{\text{max}}$  des canaux de faible affinité. Ces résultats non seulement confirment que la membrane luminale distale est le site des canaux  $\text{Ca}^{2+}$ , mais ils laissent de plus supposer que ces canaux appartiennent aux types L, P/Q et T.

**Mots clés :** transport de calcium rénal, canaux calciques, diltiazem, mibéfradil,  $\omega$ -conotoxine.

[Traduit par la Rédaction]

## Introduction

Indications for the administration of calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) channel blockers are multiple: hypertension, atherosclerosis, angina, tachycardia, fibrillation (Endo et al. 2000; Andresdottir et al. 2001; Mancini 2002), chronic renal disease such as di-

abetic nephropathy (Deray 1999) or renal insufficiency of various origins (Kestenbaum et al. 2001), and prevention of cyclosporin A nephrotoxicity (Kuhn et al. 1998). It is probable that, in the near future, new indications for this use, such as premature uterine contractions during pregnancy, will be recommended, since  $\text{Ca}^{2+}$  channels have been shown to mediate  $\text{Ca}^{2+}$  flux in the uterus and thereby play a role in parturition (Lockwood 1997; Papatsonis et al. 1997; Tribe 2001).  $\text{Ca}^{2+}$  channels in the apical membrane of distal tubules have been described for many years, using several techniques such as patch clamp in cell cultures (Poncet et al. 1992) and in microdissected rabbit connecting tubules (Tan and Lau 1993), measurement of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in MDCK cells following "shock wave lithotripsy" (Jan et al. 1998), and molecular biology (Hoenderop et al. 2000, 2001). One ques-

Received 1 October 2003. Published on the NRC Research Press Web site at <http://cjpp.nrc.ca> on 22 January 2004.

M.G. Brunette,<sup>1</sup> M. Leclerc, D. Couchourel, J. Mailloux, and Y. Bourgeois. Maisonneuve-Rosemont Hospital, 5415, Blvd. l'Assomption, and University of Montreal, Montreal, QC H1T 2M4, Canada.

<sup>1</sup>Corresponding author (e-mail: [redacted])



**Table 1.** Enzyme activities (nmol·µg<sup>-1</sup>·15 min<sup>-1</sup>) in the various preparations.

Enzyme	Proximal tubules		Distal tubules	
	Homogenates	Luminal membranes	Homogenates	Luminal membranes
Alkaline phosphatase	5.2±0.4	25.1±3.2	1.65±0.25	7.8±0.7
Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> ATPase	1.49±0.13	2.57±0.17	2.36±0.35	4.1±1.3
Succinate dehydrogenase	108	9.7	193±8.6	Trace
Glucose-6-phosphatase	3.7	0.73	0.88±0.07	0.81±0.42

tion, however, remains to be debated: is the distal tubule luminal membrane the site of one or several types of Ca<sup>2+</sup> channel? Until recently, only one Ca<sup>2+</sup> channel was suspected to be present in this membrane, a channel named ECac, which is sensitive to parathyroid hormone (PTH) (Backskai and Friedman 1990) and to 1.25 (OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> (Bindels et al. 1991) and colocalizes with calbindin 28K in the distal tubule (Hoenderop et al. 1999, 2000).

According to Gesek and Friedman (1992, 1993), however, the action of PTH on this Ca<sup>2+</sup> channel is indirect, through activation of a chloride pathway, membrane hyperpolarization, and opening of a dihydropyridine-sensitive channel. Since the combined exposure of mouse distal tubules to PTH and calcitonin had no additive effects on Ca<sup>2+</sup> influx or intracellular Ca<sup>2+</sup> content, the authors concluded that, although the signaling system might differ, the two hormones act through similar mechanisms (i.e., an increase in chloride conductance). These PTH-activated Ca<sup>2+</sup> channels were sensitive to nifedipine, the anti-L-type inhibitor, but insensitive to verapamil, also an L-type inhibitor that binds to the intracellular surface of the membrane, and to an anti N-type ω-conotoxin (Matsunaga et al. 1994). In patch-clamp experiments using microdissected rabbit tubules, Tan and Lau (1993) also observed a channel in the PTH-sensitive distal segment. This channel has been characterized as an L-type by Northern blot and RT-PCR techniques (Zhao et al. 2002).

More recently, however, several studies have reported the presence of two Ca<sup>2+</sup> channels in the distal tubule. Using purified luminal membranes from rabbit distal tubules, our laboratory has detected a dual kinetics of Ca<sup>2+</sup> transport by these vesicles. Incubation of these tubules with PTH, calbindin 28K, estrogen, and angiotensin II enhanced the high-affinity component (Bouhtiauy et al. 1994; Lajeunesse et al. 1994; Brunette et al. 1999, 2001; Charbonneau et al. 2001), whereas calcitonin influenced exclusively the low-affinity component (Zuo et al. 1997). These findings reflect a heterogeneity within the distal tubule — a heterogeneity that was previously reported in microdissection studies by the group of Morel (Chabardes et al. 1980). These authors described that in rabbit distal tubules there are distinct sections with specific hormone sensitivities and responses of adenylate cyclase. The presence of two systems of Ca<sup>2+</sup> transport in the distal segments was also reported using molecular biology (Barry et al. 1998; Peng et al. 2000; Peng and Hediger 2002; Andreassen et al. 2000; Ohki et al. 2001) and electrophysiology techniques (Suzuki et al. 2000).

The purpose of the present study was to further characterize the various systems of Ca<sup>2+</sup> transport detected in the distal luminal membrane by investigating their sensitivity to Ca<sup>2+</sup> channel inhibitors. The results indicate that, indeed, this membrane is the site of three Ca<sup>2+</sup> channels that respond

to different types of inhibitors, thus suggesting that they belong to the L, P/Q, and T-types.

## Materials and methods

### Tubule preparation

Fresh rabbit kidneys were obtained directly from the slaughterhouse (Zinman Co., Montreal, Que.). The cortex was minced and digested with 1 mg/mL of collagenase for 20 min at 37 °C in Dulbecco's modified Eagle's medium nutrient mixture F-12 Ham (HAM F-12) buffer, with 5 mg/mL of bovine serum albumin (BSA). The tissue was filtered through a stainless steel mesh, and the filtrate was centrifuged at 200g for 20 s. The tubule pellets were washed three times in Krebs-Henseleit (KH) solution and BSA, suspended in a culture medium containing 40% Percoll (final concentration) saturated with 95% O<sub>2</sub> – 5% CO<sub>2</sub>, and centrifuged for 30 min at 28 000g (at 4 °C).

The distal- and proximal-tubule-enriched bands were collected and washed three times in KH. In a number of experiments, tubules were incubated with 10<sup>-8</sup> M hPTH (1–34) in HAM F-12 for 10 min at 37 °C, and then washed in KH. The tubules were finally suspended in a hypotonic solution of 10 mM mannitol with 20 mM Tris-HEPES (pH 7.4), and frozen at –80 °C until the day of the experiment.

### Luminal membrane purification

On the day of the experiment, the luminal membranes were purified using the MgCl<sub>2</sub> precipitation technique. The tubules were thawed and homogenized with 10 strokes of a Potter homogenizer. Following the addition of 12 mM MgCl<sub>2</sub> (final concentration), the suspensions were stirred on ice for 20 min (proximal tubules) or 10 min (distal tubules) and centrifuged at 3000g for 20 min at 4 °C. The membranes were collected from the supernatant by centrifugation at 28 000g for 20 min at 4 °C. Finally, the purified membranes were washed twice, suspended in 280 mM mannitol, 20 mM Tris-HEPES (pH 7.4) and allowed to vesiculate at 4 °C for 1 h. Table 1 shows the specific activity of enzyme markers associated with these membranes.

### Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup> uptake measurement

Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup> uptakes were measured by the rapid filtration technique using Millipore filters (HAWP 0.45 µm pore size). Uptake was initiated by mixing 5 µL of membrane vesicle suspension (approximately 20 µg protein) with 25 µL of incubation medium prewarmed to 35 °C. In Ca<sup>2+</sup> uptake experiments, the incubation medium contained either 120 mM NaCl and 20 mM choline chloride or 140 mM choline chloride, 20 mM Tris-HEPES (pH 7.4), and, unless otherwise specified, 0.1 or 0.5 mM <sup>45</sup>CaCl<sub>2</sub> with or without

diltiazem,  $\omega$ -conotoxin MVIIC, or mibefradil. In the experiments concerning  $\text{Na}^+$  uptake, the incubation medium contained 1 mM  $^{22}\text{NaCl}$ , 278 mM mannitol, and 20 mM Tris-HEPES (pH 7.4). At the indicated time, the suspension was rapidly filtered and the filters were rinsed with 6 mL of cold stop solution containing (i) 150 mM KCl, 20 mM Tris-HEPES (pH 7.4), and 2 mM EGTA for  $\text{Ca}^{2+}$  transport, or (ii) 140 mM  $\text{LiCl}_2$  with 20 mM Tris-HEPES (pH 7.4) for  $\text{Na}^+$  transport experiments. For each experiment, nonspecific binding to the membranes at time zero was subtracted from the total uptake.

### Materials

Diltiazem was kindly provided by Nordic Merrell Dow Company (Laval, Que.), and mibefradil was provided by Hoffman-Laroche Co. (Basel, Switzerland).  $\omega$ -Conotoxin MVIIC,  $\omega$ -agatoxin IVA, and  $\omega$ -conotoxin MVIIC were purchased from Calbiochem Company (San Diego, Calif.), and hPTH (1–34) was purchased from Peninsula Laboratories Inc. (Belmont, Calif.). The chemicals used were of the highest grade available.  $^{45}\text{Ca}$  (carrier free) and  $^{22}\text{Na}$  were obtained from New England Nuclear Research Products (Boston, Mass.).

### Statistics and calculations

All transports were carried out in duplicate, and the experiments were repeated several times as indicated in the legends to the figures. Data were evaluated statistically by the Student's paired two-tailed *t* test. Kinetic parameters of  $\text{Ca}^{2+}$  uptake were calculated using a nonlinear regression analysis program, as described by Huntson (1975).

## Results

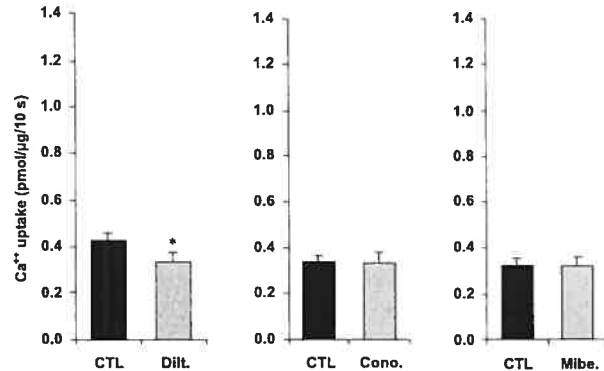
### Effects of diltiazem, $\omega$ -conotoxin MVIIC, and mibefradil on $\text{Ca}^{2+}$ uptake by the luminal membranes of the proximal tubule

None of the three inhibitors added to the vesicle suspensions influenced the time course of 0.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  transport by the proximal tubule brush-border membranes.  $\text{Ca}^{2+}$  uptake was  $0.63 \pm 0.07$  versus  $0.70 \pm 0.09$  (NS),  $0.55 \pm 0.06$  versus  $0.54 \pm 0.08$  (NS), and  $0.55 \pm 0.08$  versus  $0.52 \pm 0.04$   $\text{pmol} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot 10 \text{ s}^{-1}$  (NS) in control versus experimental conditions using diltiazem (the L-type channel inhibitor),  $\omega$ -conotoxin MVIIC (the P/Q type channel inhibitor), and mibefradil (the T-type channel inhibitor), respectively.

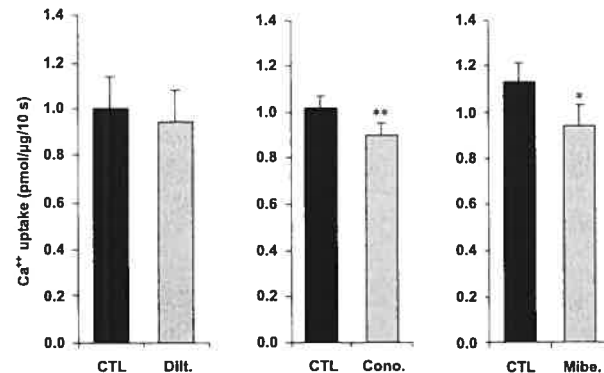
### Effects of diltiazem, $\omega$ -conotoxin MVIIC, and mibefradil on $\text{Ca}^{2+}$ uptake by the distal luminal membranes in the absence of $\text{Na}^+$

The three inhibitors had no influence on the proximal tubule, but all of them decreased  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by the distal luminal membranes. The effect was extremely rapid, since it was already detectable within a few seconds. However, as shown in Figs. 1 and 2, the efficiency of these inhibitors depended upon the concentration of  $\text{Ca}^{2+}$ . The 0.1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  uptake was  $0.42 \pm 0.03$  and  $0.33 \pm 0.04$   $\text{pmol} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot 10 \text{ s}^{-1}$  ( $P < 0.05$ ,  $n = 3$ ) in media containing the carrier or 50  $\mu\text{M}$  diltiazem but was not influenced by either 100 nM  $\omega$ -conotoxin MVIIC ( $0.34 \pm 0.02$  vs.  $0.33 \pm 0.04$   $\text{pmol} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot 10 \text{ s}^{-1}$ ,

**Fig. 1.** Effect of 50  $\mu\text{M}$  diltiazem (Dilt), 100 nM  $\omega$ -conotoxin MVIIC (Cono.), and 1  $\mu\text{M}$  mibefradil (Mibe.) on the 10-s 0.1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by the distal tubule luminal membrane vesicles in the absence of  $\text{Na}^+$ .  $n = 3, 4$ , and 4, for the three groups of experiments, respectively. \*,  $P < 0.05$ .



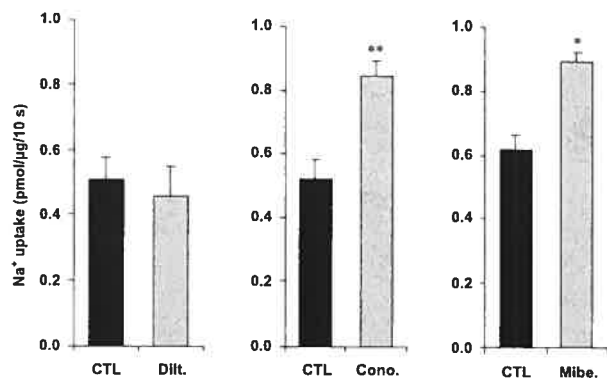
**Fig. 2.** Effect of 50  $\mu\text{M}$  diltiazem (Dilt), 100 nM  $\omega$ -conotoxin MVIIC (Cono.), and 1  $\mu\text{M}$  mibefradil (Mibe.) on the 10-s 0.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by the distal tubule luminal membrane vesicles in the absence of  $\text{Na}^+$ . \*,  $P < 0.05$  ( $n = 7$ ); \*\*,  $P < 0.01$  ( $n = 3$ ).



$n = 3$ , NS) or 1  $\mu\text{M}$  mibefradil ( $0.31 \pm 0.03$  vs.  $0.32 \pm 0.04$ ,  $n = 4$ , NS). In contrast, 0.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  transport was decreased from  $1.02 \pm 0.05$  to  $0.90 \pm 0.05$   $\text{pmol} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot 10 \text{ s}^{-1}$  ( $P < 0.01$ ,  $n = 3$ ) by 100 nM  $\omega$ -conotoxin MVIIC, and from  $1.13 \pm 0.09$  to  $0.94 \pm 0.09$   $\text{pmol} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot 10 \text{ s}^{-1}$  ( $P < 0.05$ ,  $n = 7$ ) by 1  $\mu\text{M}$  mibefradil, but remained insensitive to diltiazem ( $0.96 \pm 0.16$  vs.  $0.94 \pm 0.16$   $\text{pmol} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot 10 \text{ s}^{-1}$ ,  $n = 7$ , NS).

Interestingly, the other types of  $\omega$ -conotoxin did not influence  $\text{Ca}^{2+}$  transport at either of the two concentrations tested. The 0.1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  uptake was  $1.26 \pm 0.22$  vs.  $1.20 \pm 0.29$   $\text{pmol} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot 10 \text{ s}^{-1}$ , ( $n = 6$ , NS), and 1.0 mM  $\text{Ca}^{2+}$  uptake was  $2.19 \pm 0.16$  vs.  $2.10 \pm 0.18$   $\text{pmol} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot 10 \text{ s}^{-1}$  ( $n = 5$ , NS) in the absence and presence of  $\omega$ -conotoxin MVIIC (the N-type channel inhibitor), whereas 0.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  uptake was  $1.64 \pm 0.30$  vs.  $1.60 \pm 0.29$   $\text{pmol} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot 10 \text{ s}^{-1}$  ( $n = 3$ , NS) and 1.0 mM  $\text{Ca}^{2+}$  uptake was  $2.14 \pm 0.34$  vs.  $1.90 \pm 0.03$   $\text{pmol} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot 10 \text{ s}^{-1}$  ( $n = 3$ , NS) in the absence and presence of  $\omega$ -agatoxin IVA (the P-type channel inhibitor).

**Fig. 3.** Effect of 200  $\mu\text{M}$  diltiazem (Dilt), 100 nM  $\omega$ -conotoxin MVIIC (Cono.), and 1  $\mu\text{M}$  mibefradil (Mibe.) on the transport of 1 mM  $^{22}\text{Na}^+$  by the distal tubule luminal membrane vesicles. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.02$  ( $n = 5$ ).



#### Effects of diltiazem, $\omega$ -conotoxin MVIIC, and mibefradil on $\text{Ca}^{2+}$ uptake in the presence of $\text{Na}^+$

In the presence of 100 mM NaCl, none of the three inhibitors influenced  $\text{Ca}^{2+}$  transport by the distal luminal membranes. The 0.1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  uptake was  $0.54 \pm 0.05$  vs.  $0.53 \pm 0.06$   $\text{pmol} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot 10 \text{ s}^{-1}$  ( $n = 3$ , NS) in the absence and presence of 50  $\mu\text{M}$  diltiazem. Similarly,  $\text{Na}^+$  interfered with the action of 100 nM  $\omega$ -conotoxin MVIIC: 0.5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  uptakes were  $0.49 \pm 0.13$  and  $0.58 \pm 0.11$   $\text{pmol} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot 10 \text{ s}^{-1}$  ( $n = 3$ , NS), and with the action of 1  $\mu\text{M}$  mibefradil they were  $0.65 \pm 0.07$  vs.  $0.68 \pm 0.08$   $\text{pmol} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot 10 \text{ s}^{-1}$  ( $n = 5$ , NS) in control and treated vesicles.

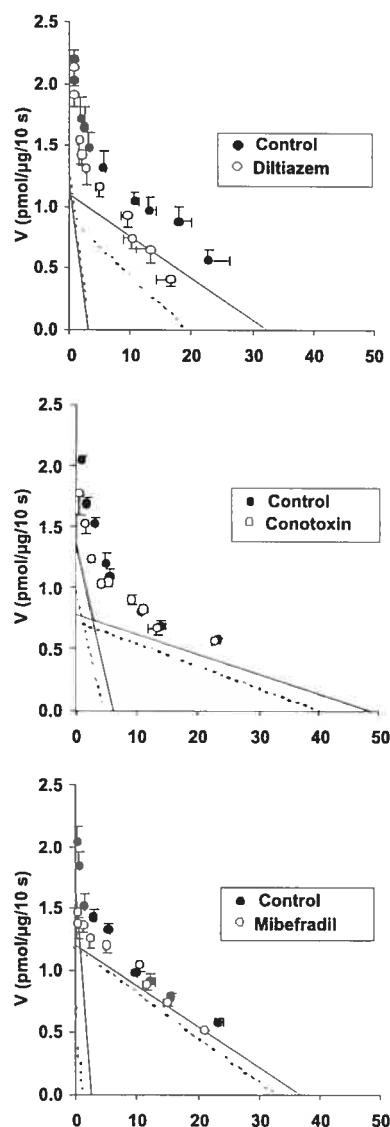
#### Effects of diltiazem, $\omega$ -conotoxin MVIIC, and mibefradil on $\text{Na}^+$ uptake

In view of the tight relationship between  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  reabsorption usually observed in the distal nephron, we also investigated the effects of the three channel inhibitors on 1 mM  $\text{Na}^+$  transport by the distal luminal membrane. The results are presented in Fig. 3. The presence of 200  $\mu\text{M}$  diltiazem did not influence 1 mM  $\text{Na}^+$  uptake by the vesicle membranes ( $0.51 \pm 0.07$  vs.  $0.46 \pm 0.09$   $\text{pmol} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot 10 \text{ s}^{-1}$ ,  $n = 3$ , NS). In contrast, 100 nM  $\omega$ -conotoxin MVIIC and 1  $\mu\text{M}$  mibefradil reproducibly enhanced the 10 s transports of 1 mM  $\text{Na}^+$  from  $0.52 \pm 0.06$  to  $0.84 \pm 0.05$   $\text{pmol} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot 10 \text{ s}^{-1}$  ( $P < 0.02$ ,  $n = 5$ ) and from  $0.62 \pm 0.04$  to  $0.89 \pm 0.03$   $\text{pmol} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot 10 \text{ s}^{-1}$  ( $P < 0.05$ ,  $n = 3$ ), respectively.

#### Which kinetic components do these channel inhibitors influence?

In a series of new experiments, we examined which kinetic component of  $\text{Ca}^{2+}$  uptake is targeted by the three channel inhibitors. The results are presented in Fig. 4 and Table 2. The presence of 200  $\mu\text{M}$  diltiazem slightly but consistently decreased the  $V_{\text{max}}$  of the high-affinity component, leaving the  $K_m$  intact. The low-affinity values remained unchanged. In contrast, 100 nM  $\omega$ -conotoxin MVIIC and 1  $\mu\text{M}$  mibefradil influenced the low-affinity component exclusively, decreasing the  $V_{\text{max}}$  value and again leaving the  $K_m$  values unchanged. The kinetic parameters of the high-

**Fig. 4.** Effects of 200  $\mu\text{M}$  diltiazem, 100 nM  $\omega$ -conotoxin MVIIC, and 1  $\mu\text{M}$  mibefradil on the Eadie-Hofstee plot of  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by the distal luminal membrane vesicles.  $n = 4$ , 3, and 3, respectively.



affinity channel remained unaffected by these two channel blockers.

#### Diltiazem prevents the action of PTH on $\text{Ca}^{2+}$ transport

PTH increases  $\text{Ca}^{2+}$  reabsorption by the distal tubule, and this action results from the stimulation of both the  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchanger in the basolateral membrane (Bouhtiauy et al. 1991) and  $\text{Ca}^{2+}$  entry through the luminal membrane. The latter effect involves the high-affinity component of  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by the luminal membrane and is observed only in the presence of  $\text{Na}^+$  (Lajeunesse et al. 1994). Since diltiazem decreases  $\text{Ca}^{2+}$  transport by the same component, we examined whether this  $\text{Ca}^{2+}$  channel blocker interferes with the hormone action. Distal luminal membranes were isolated

**Table 2.** Effect of 50  $\mu\text{M}$  diltiazem, 100 nM  $\omega$ -conotoxin MVIIC, and 1  $\mu\text{M}$  mibefradil on the kinetic parameters of  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by distal luminal membranes.

	High affinity		Low affinity	
	$K_m$ (mM)	$V_{\max}$ ( $\text{pmol}\mu\text{g}^{-1}\cdot 10\text{ s}^{-1}$ )	$K_m$ (mM)	$V_{\max}$ ( $\text{pmol}\mu\text{g}^{-1}\cdot 10\text{ s}^{-1}$ )
Control	0.034 $\pm$ 0.006	1.11 $\pm$ 0.03	0.40 $\pm$ 0.09	1.19 $\pm$ 0.04
Diltiazem ( $n = 4$ )	0.048 $\pm$ 0.01	0.90 $\pm$ 0.06**	0.39 $\pm$ 0.09	1.23 $\pm$ 0.04
Control	0.016 $\pm$ 0.002	0.76 $\pm$ 0.013	0.20 $\pm$ 0.03	1.38 $\pm$ 0.044
$\omega$ -Conotoxin ( $n = 3$ )	0.018 $\pm$ 0.005	0.73 $\pm$ 0.09	0.15 $\pm$ 0.043	0.97 $\pm$ 0.11*
Control	0.033 $\pm$ 0.01	1.21 $\pm$ 0.07	0.66 $\pm$ 0.09	1.70 $\pm$ 0.15
Mibefradil	0.037 $\pm$ 0.01	1.19 $\pm$ 0.10	0.90 $\pm$ 0.07	0.70 $\pm$ 0.05**

Note: \*,  $P < 0.05$ , and \*\*,  $P < 0.02$  (Student's paired  $t$  test compared with the control values).

from tubules incubated with  $10^{-8}$  M hPTH (1–34) or the carrier for 10 min at 37 °C. Then, 0.05 mM  $\text{Ca}^{2+}$  uptake was measured with and without 50  $\mu\text{M}$  diltiazem in a medium containing 100 mM NaCl, 35 mM choline Cl, and 20 mM Tris-HEPES (pH 7.5). The 10-s uptakes are presented in Fig. 5. As expected, in the presence of  $\text{Na}^+$ ,  $10^{-8}$  M PTH enhanced this uptake, and this effect was completely abolished by the addition of diltiazem, thus confirming, using a different technique, the data reported by Matsunaga et al. (1994) in patch-clamp experiments.

## Discussion

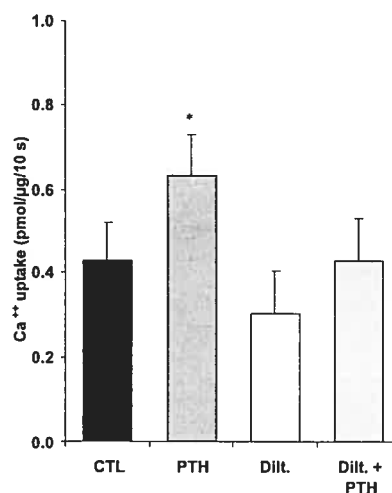
### Are there $\text{Ca}^{2+}$ channels in the proximal luminal membrane?

Using a single-channel patch-clamp technique on rabbit cultured proximal tubule cells, Zhang and O'Neil (1996a, 1996b) detected two  $\text{Ca}^{2+}$  channels permeable to both  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Ba}^{2+}$ , one being sensitive, whereas the other was not, to stretch manipulations. These channels were downregulated by nifedipine and therefore belong to the L-type.

The reasons why we failed to detect such channels are unclear. Further experiments should analyze the effect of factors such as tubule freezing and tonicity of the media that we used on the eventual detection of channels.

### Three types of $\text{Ca}^{2+}$ channels in the distal luminal membrane

As mentioned above, the presence of two types of  $\text{Ca}^{2+}$  channels in the distal tubule has been confirmed in several studies using various techniques. Barry et al. (1998) cloned two cDNAs corresponding to the  $\alpha$ -1c preforming subunit, and to the  $\beta$ -3 subunit. Antisense oligonucleotides complementary to the  $\alpha$ -1c sequence inhibited the sensitivity to thiazides, whereas antisense complementary to the  $\beta$ -3 sequence inhibited both the thiazide and PTH responses. Suzuki et al. (1999) cloned and isolated two  $\text{Ca}^{2+}$  channels from rat (rat ECAC) and mouse (mouse CaT1) kidneys. RT-PCR studies localized CaT1 in the ascending limb. Hoenderop et al. (2000, 2001) further determined that ECAC (CaT2) was expressed in vitamin-D-responsive segments of distal tubules. The activities of these channels were investigated by patch-clamp techniques (Suzuki et al. 2000). cAMP activated exclusively the CaT1 channel, thus confirming the previously reported data showing that this messenger enhances the low-affinity channel while leaving the high-affinity channel intact (Hilal et al. 1997). (Peng et al. 2000;

**Fig. 5.** Effect of 50  $\mu\text{M}$  diltiazem (Dilt.) on 0.05 mM  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by the distal luminal membranes from tubules incubated with  $10^{-8}$  M human parathyroid hormone (hPTH) (1–34). CTL, control; \*,  $P < 0.05$ .

Peng and Hediger 2002) also reported new convincing data providing evidence for the presence of two distinct  $\text{Ca}^{2+}$  channels in the distal nephron. They isolated a cDNA encoding the protein CaT2 which, unlike the previously described ECAC, was kidney specific in the rat. The expression pattern of CaT2 was similar to that of calbindin D28K, and the two proteins were colocalized in the same cells. CaT2 was slightly affected by diltiazem and was still active in the presence of 100 mM NaCl (the authors, however, did not compare the channel activity in the presence vs. absence of NaCl). Finally, Ohki et al. (2001) provided additional information concerning these two channels. They observed that ECAC1 (CaT2) was regulated by  $1,25(\text{OH})_2$  vitamin  $\text{D}_3$ , whereas ECAC2 (CaT1) was exclusively influenced by calcitonin, two properties that exactly correspond to the high- and low-affinity components of  $\text{Ca}^{2+}$  uptake kinetics. Here again, ECAC2 mRNA was detected in the cortical ascending limb (i.e., the segment containing the calcitonin-sensitive adenylate cyclase) (Chabardes et al. 1980; Morel 1981).

To summarize all of these data and simplify the terms, CaT1 is present in the ascending limb and the early distal segment; it is calcitonin dependent and is responsible for the low-affinity component of  $\text{Ca}^{2+}$  uptake, an observation

which, in a finalistic point of view, is logical considering the normal concentrations of  $\text{Ca}^{2+}$  in the corresponding tubular fluid.  $\text{CaT2}$  is present in the distal convoluted tubule and is sensitive to PTH, calbindin 28K, and angiotensin II. Its high affinity for  $\text{Ca}^{2+}$  allows this channel to reabsorb low concentrations of  $\text{Ca}^{2+}$ , such as those present in the late distal segments. The present experiments suggest that a third type of channel also contributes to the  $\text{Ca}^{2+}$  reabsorption in the distal nephron.

### The three $\text{Ca}^{2+}$ channels in the distal nephron belong to the L, P/Q, and T-types

The presence of L-type channels was already known, since, according to Bacskai and Friedman (1990), the action of PTH on  $\text{Ca}^{2+}$  channels in mouse cell cultures is inhibited by nifedipine. Later, Jan et al. (1998) also described the presence of diltiazem-sensitive channels in MDCK cells. Therefore, our study confirms the sensitivity of these L-type channels to PTH. The fact that in the present experiments the low-affinity  $\text{Ca}^{2+}$  channel is sensitive to  $\omega$ -conotoxin MVIIC suggests that this second channel belongs to the P/Q type, in contrast to the high-affinity channel described above. The N and P/Q type  $\text{Ca}^{2+}$  channels have essentially been found in the nervous system, particularly in the cerebellar Purkinje cells (Pinto et al. 1998; Stephens et al. 2001). The dysfunction of these channels might be at the origin of several diseases, such as epilepsy (Jouvenceau et al. 2001) or ataxia (Guida et al. 2001). Some P/Q  $\text{Ca}^{2+}$  channels are also present in the renal afferent arterioles (Hansen et al. 2000), but to our knowledge this type has not been detected yet in the distal tubule.

Finally, the sensitivity of  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by our distal tubule vesicles to mibefradil reflects the presence of a third  $\text{Ca}^{2+}$  channel, which belongs to the T-type. This finding confirms data reported by Yu et al. (1992), who described, in the nephron, a family of transcripts encoding different pore-forming subunits and by Andreassen et al. (2000), who identified in the microdissected rat nephron a  $\alpha\text{1G}$  mRNA, which, according to these authors, possesses the T-type characteristics. This subunit was detected in the connecting tubule, as well as in the cortical collecting tubule.

Therefore, three, instead of two, types of  $\text{Ca}^{2+}$  channel are present in the distal segments — that is, the P/Q type in the early, calcitonin-sensitive distal tubule; an L-type in the PTH sensitive segment; and a T-type, which is probably localized in the connecting tubule.

### The effect of the $\text{Ca}^{2+}$ channel blockers on $\text{Na}^+$ transport

$\omega$ -Conotoxin MVIIC and mibefradil enhanced  $\text{Na}^+$  transport by the distal luminal membranes, whereas diltiazem did not. This provides further evidence that the  $\text{Ca}^{2+}$  channels targeted by these inhibitors are different. It is probable, indeed, that the low-affinity  $\text{Ca}^{2+}$  channels, which are sensitive to  $\omega$ -conotoxin MVIIC and mibefradil, are permeable to both  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^+$  in a competitive manner. Any hormone, such as calcitonin, or any diuretic, such as thiazides, that enhances  $\text{Ca}^{2+}$  transport by the low-affinity channel will curtail  $\text{Na}^+$  uptake. Conversely, any  $\text{Ca}^{2+}$  channel blocker that targets this channel will increase  $\text{Na}^+$  transport. As shown in the present study, this is the case for  $\omega$ -conotoxin MVIIC

and mibefradil. The reason why diltiazem, which targets the high-affinity PTH-sensitive channel, did not significantly influence  $\text{Na}^+$  uptake suggests that the interaction of  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  within this channel is due to a noncompetitive mechanism, as previously demonstrated in our laboratory with Eadie-Hofstee plot experiments (Brunette et al. 1992).

### Conclusions

The distal tubule is a heterogeneous structure whose luminal membrane is the site of at least three types of  $\text{Ca}^{2+}$  channels. The high-affinity channels, which have been previously shown to be influenced by parathyroid hormone and calbindin 28K, are sensitive to diltiazem and therefore belong to the L-type, whereas the low-affinity channels, which are regulated by calcitonin and probably other hormones, are sensitive to  $\omega$ -conotoxin MVIIC and mibefradil and belong to the Q and T types. Considering the microdissection studies previously reported by several groups of investigators, it is probable that these channels are localized in different and very specific segments of the distal nephron.

### Acknowledgements

This work was supported by Nordic Merrell Dow Co., Canada, and Medical Research Council of Canada #MT11307. The authors are grateful to Jean-Marie Bélanger for kindly providing the rabbit kidneys and to Eva Marie Gutknecht and Pierre Weber, Hoffman-Laroche Co., Basel, Switzerland, who kindly provided the mibefradil.

### References

- Andreassen, D., Jensen, B.L., Hansen, P.B., Kwon, T.H., Nielsen, S., and Skott, O. 2000. The  $\alpha\text{1a}$ -subunit of a voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channel is localized in rat distal nephron and collecting duct. *Am. J. Physiol.* 279: F997–F1005.
- Andresdottir, M.B., VanHamersvelt, H., VanHelden, M.J., Hoitsma, A.J., and Huysman, F.T. 2001. The effect of dihydropyridine calcium channel blockers on microalbuminuria in patients with essential hypertension. *In* Proceedings of the American Society of Nephrology Annual Meeting, San Francisco, Calif., 10–17 October 2001.
- Bacskai, B.J., and Friedman, P.A. 1990. Activation of latent  $\text{Ca}^{2+}$  channels in renal epithelial cells by parathyroid hormone. *Nature* (London), 347: 388–391.
- Barry, E.L.R., Gesek, F.A., Yu, A.S.L., Lytton, J., and Friedman, P.A. 1998. Distinct calcium channel isoforms mediate parathyroid hormone and chlorothiazide stimulated calcium entry in transporting cells. *J. Membr. Biol.* 161: 55–64.
- Bindels, R.J.M., Martog, A., Timmermans, J., and Van Os, C.H. 1991. Active  $\text{Ca}^{2+}$  transport in primary cultures of rabbit kidney CCD: stimulation by 1,25 dihydroxyvitamin  $\text{D}_3$  and PTH. *Am. J. Physiol.* 261: F799–F807.
- Bouhtiauy, I., Lajeunesse, D., and Brunette, M.G. 1991. The mechanism of PTH action on calcium reabsorption by the distal tubule. *Endocrinology*, 128: 251–258.
- Bouhtiauy, I., Lajeunesse, D., Christakos, S., and Brunette, M.G. 1994. The two vitamin  $\text{D}_3$ -dependent calcium binding proteins increase calcium reabsorption by different mechanisms. I. Effect of CaBP 28K. *Kidney Int.* 45: 461–468.
- Brunette, M.G., and Leclerc, M. 2001. Effect of estrogen on calcium and sodium transport by the nephron luminal membranes. *J. Endocrinol.* 170: 441–450.

- Brunette, M.G., Mailloux, J., and Lajeunesse, D. 1992. Calcium transport through the luminal membrane of the distal tubule. I. Interrelationship with sodium. *Kidney Int.* **41**: 271–288.
- Brunette, M.G., Leclerc, M., Huo, T.L., Poreta, A., and Christakos, S. 1999. Effect of calbindin 28K on sodium transport by the luminal membrane of the rabbit nephron. *Mol. Cell. Endocrinol.* **152**: 161–168.
- Chabardes, D., Brunette, M.G., Imbert-Teboul, M., Gontcharevskaya, O., Montegut, M., Clique, A., and Morel, F. 1980. Adenylate cyclase responsiveness to hormones in various portions of the human nephron. *J. Clin. Invest.* **65**: 439–448.
- Charbonneau, A., Leclerc, M., and Brunette, M.G. 2001. Effect of angiotensin II on calcium reabsorption by the luminal membranes of the nephron. *Am. J. Physiol.* **280**: E928–E936.
- Deray, G. 1999. Nephroprotective effect of calcium antagonists. *Presse Med.* **28**: 1667–1670.
- Endo, M., Kurachi, Y., and Mishina, M. 2000. Pharmacology of ionic channel. Function: activators and inhibitors. *In* Handbook of experimental pharmacology. Vol. 147. Springer-Verlag, Berlin. pp. 119–154.
- Gesek, F.A., and Friedman, P.A. 1992. On the mechanism of parathyroid hormone stimulation of calcium uptake by mouse distal convoluted tubule cells. *J. Clin. Invest.* **90**: 749–758.
- Gesek, F.A., and Friedman, P.A. 1993. Calcitonin stimulates calcium transport in distal convoluted tubule cells. *Am. J. Physiol.* **264**: F744–F751.
- Guida, S., Trettel, F., Pagnuiti, S., Mantuano, E., Tottene, A., Veneziano, L., Fellin, T., Spadaro, M., Stauderman, K., Williams, M., Volsen, S., Ophoff, R., Frants, R., Jodice, C., Frontali, M., and Pietrobon, D. 2001. Complete loss of P/Q calcium channel activity caused by a CACNA1A missense mutation carried by patients with episodic ataxia type 2. *Am. J. Human Genet.* **68**: 759–764.
- Hansen, P.B., Jensen, B.L., and Andreassen, D. 2000. Vascular smooth muscle cells express the  $\alpha_{1A}$  subunit of P/Q type voltage dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channel, and it is functionally important in renal afferent arterioles. *Circ. Res.* **87**: 896–902.
- Hilal, G., Claveau, D., Leclerc, M., and Brunette, M.G. 1997.  $\text{Ca}^{2+}$  transport by the luminal membrane of the distal nephron: Action and interaction of protein kinases A and C. *Biochem. J.* **328**: 371–375.
- Hoenderop, J.G.J., Van der Kemp, A.W.C.M., Hartog, A., Van De Graaf, S.F.J., Van Os, C.H., Willems, P.H.G.M., and Bindels, R.J.M. 1999. Molecular identification of the apical  $\text{Ca}^{2+}$  channel in 1,25-dihydroxyvitamin  $\text{D}_3$  responsive epithelia. *J. Biol. Chem.* **274**: 8375–8378.
- Hoenderop, J.G.J., Hartog, A., Stuver, M., Doucet, A., Willem, P.H.G.M., and Bindels, R.J.M. 2000. Localization of the epithelial  $\text{Ca}^{2+}$  channel in rabbit kidney and intestine. *J. Am. Soc. Nephrol.* **11**: 1171–1178.
- Hoenderop, J.G.J., Vennekens, R., Mueller, D., Van Os, C.H., Prenen, J., Droogman, G., Nilius, B., and Bindels, R.J.M. 2001. Function and expression of the epithelial calcium channel family: comparison of  $\text{ECaC}_1$  and  $\text{ECaC}_2$ . *In* Proceedings of the American Society of Nephrology Annual Meeting, San Francisco, Calif., 10–17 October 2001.
- Huntson, D.L. 1975. Two techniques for evaluating small molecule-macro molecule binding in complex systems. *Anal. Biochem.* **63**: 99–109.
- Jan, C.R., Chen, W.C., Wu, S.N., and Tseng, C.J. 1998. Nifedipine, verapamil and diltiazem block shock wave induced rises in cytosolic calcium in MDCK cells. *Clin. J. Physiol.* **41**: 181–188.
- Jouveneau, A., Funson, L.H., Spauschus, A., Ramesh, V., and Zuberi, S.M. 2001. Human epilepsy associated with dysfunction of the brain P/Q-type calcium channel. *Lancet*, **358**: 801–807.
- Kestenbaum, B.R., Gillen, D., Sherrard, D., Seliger, S., Ball, A., and Stehman-Breen, C. 2001. Calcium channel blocker use and mortality among patients with end stage renal disease. *In* Proceedings of the American Society of Nephrology Annual Meeting, San Francisco, Calif., 10–17 October 2001.
- Kuhn, U.D., Lupp, A., Kostka, E., Kuhl, A., Baloch, A., Stein, G., and Fleck, C. 1998. Is there a beneficial effect of the calcium channel blocker diltiazem on cyclosporine A nephrotoxicity in rats? *Exp. Toxicol. Pathol.* **50**: 484–490.
- Lajeunesse, D., Bouhtiauy, I., Mailloux, J., and Brunette, M.G. 1994. Parathyroid hormone and hydrochlorothiazide increase calcium transport by the luminal membrane of rabbit distal nephron segments through different pathways. *Endocrinology*, **134**: 35–41.
- Lockwood, C.J. 1997. Calcium channel blockers in the management of preterm labour. *Lancet*, **350**: 1339–1340.
- Mancini, G.B.J. 2002. Antiatherosclerotic effects of calcium channel blockers. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **45**: 1–20.
- Matsunaga, A.H., Stanton, B.A., Gesek, F.A., and Friedman, P.A. 1994. Epithelial  $\text{Ca}^{2+}$  channels sensitive to dihydropyridines and activated by hyperpolarizing voltages. *Am. J. Physiol.* **267**: C157–C165.
- Morel, F. 1981. Sites of hormone action in the mammalian nephron. *Am. J. Physiol.* **240**: F159–F164.
- Ohki, G., Suzuki, M., Matsumoto, N., Tshuruoka, S., Ishibashi, K., and Imai, M. 2001. Regulation of  $\text{ECaC}_2$  ( $\text{CAT}_1$ ) by low Ca diet and calcitonin in the kidney. *In* Proceedings of the American Society of Nephrology Annual Meeting, San Francisco, Calif., 10–17 October 2001.
- Papatsonis, D., Van Geijn, H.P., Ader, J., Lange, F.M., Bleker, O.P., and Dekker, G.A. 1997. Nifedipine and ritodrine in the management of preterm labor: a randomized multicenter trial. *Obstet. Gynecol.* **90**: 230–234.
- Peng, J.B., and Hediger, M.A. 2002. A family of calcium-permeable channels in the kidney: distinct roles in renal calcium handling. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **11**: 555–561.
- Peng, J.B., Chen, X.Z., Berger, U.V., Vassilev, P.M., Brown, E.M., and Hediger, M.A. 2000. A rat kidney-specific calcium transporter in the distal nephron. *J. Biol. Chem.* **275**: 28 186 – 28 194.
- Pinto, A., Gillard, S., Moss, F., Whyte, K., Brust, P., Williams, M., Stauderman, K., Harpold, M., Lang, B., Newsom-Davis, J., Bleakman, D., Lodge, D., and Boot, J. 1998. Human autoantibodies specific for  $\alpha_1$ -A calcium channel subunit reduce both P-type and Q type calcium currents in cerebellar neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 8328–8333.
- Poncet, V., Merot, J., and Pougeol, P. 1992. A calcium permeable channel in the apical membrane of primary culture of the rabbit distal bright convoluted tubule. *Pflügers Arch.* **422**: 112–119.
- Stephens, G.J., Morris, N.P., Fyffe, R.E., and Robertson, B. 2001. The  $\text{Cav}2.1/\alpha_1\text{A}$  (P/Q type) voltage dependent calcium channel mediates inhibitory neurotransmission onto mouse cerebellar purkinje cells. *Eur. J. Neurosci.* **13**: 1902–1912.
- Suzuki, M., Sato, J., Kutsuwada, K., Ookim, G., and Imai, M. 1999. Cloning of a stretch-inhibitable non selective cation. *J. Biol. Chem.* **274**: 6330–6335.
- Suzuki, M., Ishibashi, K., Ookim, G., Tsuruoka, S., and Imai, M. 2000. Electrophysiologic characteristics of  $\text{Ca}$ -permeable channels,  $\text{ECaC}$  and  $\text{Ca}_T$ , in the kidney. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **274**: 344–349.
- Tan, S., and Lau, K. 1993. Patch-clamp evidence for calcium chan-

- nels in apical membranes of rabbit kidney connecting tubules. *J. Clin. Invest.* **92**: 2731–2736.
- Tribe, R.M. 2001. Regulation of human myometrial contractility during pregnancy and labor: are calcium homeostatic pathways important? *Exp. Physiol.* **86**: 247–254.
- Yu, A.S., Hebert, S.C., Brenner, B.M., and Lytton, J. 1992. Molecular characterization and nephron distribution of a family of transcripts encoding the pore-forming subunit of  $\text{Ca}^{2+}$  channels in the kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 10 494 – 10 498.
- Zhang, M.I., and O'Neil, R.G. 1996a. An L-type calcium channel in renal epithelial cells. *J. Membr. Biol.* **154**: 259–266.
- Zhang, M.I., and O'Neil, R.G. 1996b. A regulated calcium channel in apical membranes of renal proximal tubule cells. *Am. J. Physiol.* **271**: C1757–C1764.
- Zhao, P.L., Wang, X.T., Zhang, X.M., Cebotaru, V., Cebotaru, L., Guo, G., Morales, M., and Guggino, S.E. 2002. Tubular and cellular localization of the cardiac L-type calcium channel in rat kidney. *Kidney Int.* **61**: 1393–1406.
- Zuo, Q., Claveau, D., Hilal, G., Leclerc, M., and Brunette, M.G. 1997. Effect of calcitonin on calcium transport by the luminal and basolateral membranes of the rabbit nephron. *Kidney Int.* **51**: 1991–1999.

## Aldosterone enhances renal calcium reabsorption by two types of channels

MARIE LECLERC, MICHÈLE G. BRUNETTE, and DENIS COUCHOUREL

Maisonneuve-Rosemont Hospital and University of Montreal, Canada

### Aldosterone enhances renal calcium reabsorption by two types of channels.

**Background.** Aldosterone has been known for many years to increase sodium ( $\text{Na}^+$ ) reabsorption by the distal nephron. The present in vitro experiments investigated the effect of the hormone on calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) transport by the luminal membrane of the rabbit nephron, independent of any systemic influence.

**Methods.** Proximal and distal tubules were incubated with either aldosterone or the carrier. The luminal membranes of these tubules were purified, vesiculated, and  $^{45}\text{Ca}$  uptake by these vesicles was subsequently measured.

**Results.** Treatment of the distal tubules with  $10^{-8}$  mol/L aldosterone enhanced both 0.1 and 0.5 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  transport. The hormone action was abolished by tyrosine kinase inhibitors. The presence of  $\text{Na}^+$  in the medium decreased both  $\text{Ca}^{2+}$  uptake and the effect of aldosterone. This hormone action was already significant after a 5-minute incubation, with a half-maximal efficient concentration of approximately  $10^{-10}$  mol/L.  $\text{Ca}^{2+}$  transport by the distal membranes presents a dual kinetics. Aldosterone enhanced the  $V_{\text{max}}$  values of both components of these kinetics. Mibefradil abolished the action of aldosterone on 0.5 mmol/L but not on 0.1 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  uptake, suggesting that the targeted low affinity channel belongs to the T-type, whereas diltiazem prevented the hormone action exclusively at the low  $\text{Ca}^{2+}$  concentration (0.1 mmol/L), indicating an effect on a high affinity L-type channel.

**Conclusion.** Aldosterone increases  $\text{Ca}^{2+}$  transport by the distal luminal membranes through L- and T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels, and this action requires tyrosine kinase activity.

It has been known for several decades that mineralocorticoid-depleted patients have a tendency to present hyponatremia, acidosis, and volume contraction, while mineralocorticoid excess provokes opposite metabolic abnormalities [1].

A number of experiments using several techniques showed that aldosterone has a highly significant effect on

transepithelial potential difference in the late segments of the nephron, reflecting a stimulation of the amiloride-sensitive  $\text{Na}^+$  transport by the apical membranes.

In contrast to the abundant literature dealing with the antinatriuretic effect of aldosterone, data concerning its action on  $\text{Ca}^{2+}$  transport are relatively scarce. Clearance studies showed either an increase in calciuria [2] or an absence of significant change of  $\text{Ca}^{2+}$  excretion [3, 4] after aldosterone administration. In a randomized study in male volunteers, Van Hamersvelt et al [5] compared the effect of the  $\text{Ca}^{2+}$  channel blocker felodipine, alone or in association with aldosterone. Felodipine alone had a natriuretic effect, which was attenuated by aldosterone. The action of felodipine was attributed to the proximal tubule. However, in this study, calciuria was not measured. Resnick et al [6] reported the cases of seven hypertensive patients with primary aldosteronism whose serum  $\text{Ca}^{2+}$  rose significantly after removal of the aldosterone-producing tumor. This rise was thought to be the result of a secondary hyperparathyroidism, rather than a direct effect of aldosterone suppression on  $\text{Ca}^{2+}$  reabsorption. Finally, Kabadi [7] observed a patient with primary hyperaldosteronism and renal calculi who presented a decline in the excretion of  $\text{Ca}^{2+}$  and uric acid after spironolactone administration. The author concluded that aldosterone decreases  $\text{Ca}^{2+}$  reabsorption.

The purpose of the present study was to investigate the effect of aldosterone on  $\text{Ca}^{2+}$  transport by the nephron, independent of any systemic changes and independent of the antinatriuretic action. The hormone did not influence electrolyte transport by the proximal membranes. In contrast and unexpectedly, treatment of rabbit distal tubules with aldosterone enhanced both  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by the corresponding luminal membranes.

## METHODS

### Tubule preparation

Fresh rabbit kidneys were directly obtained from the slaughterhouse. The rabbit strains were heterogeneous (New Zealand, Satin, Chinchilla, and California) equally males and females, 9 to 13 weeks old. The renal

**Key words:** aldosterone, renal calcium reabsorption, mineral transport regulation.

Received for publication October 27, 2003  
and in revised form January 19, 2004  
Accepted for publication February 5, 2004

© 2004 by the International Society of Nephrology



cortical tissue was minced and first digested for 5 minutes at 35°C in HAMF-12 culture medium equilibrated with 95% O<sub>2</sub>, and containing 1 mg/mL collagenase type V clostridium histolyticum with 5 mg/mL bovine serum albumin (BSA). The tissue was rinsed with the culture medium in a tea strainer and again digested for 20 minutes at 35°C in the same medium containing collagenase, BSA, and 10,000 U/mL DNase. This new suspension was filtered, and the filtrate was centrifuged for 20 seconds in a table centrifuge. The collected tubules were rinsed with Krebs-Henseleit buffer (KHB) and BSA, and finally suspended in the culture medium containing 45% Percoll equilibrated with 95% O<sub>2</sub>. After centrifugation for 30 minutes at 28,000g, the distal and proximal tubule enriched bands were collected separately and washed in KHB with BSA to remove the Percoll. The distal tubule suspensions, visualized under the microscope, contained a mixture of distal convoluted tubules, connecting tubules, and cortical collecting ducts.

#### Incubation of the tubules with aldosterone

The tubules were incubated with aldosterone or the carrier in HAMF-12 at 35°C for 5 minutes unless otherwise specified. Incubation was stopped by rapid dilution in ice-cold KHB/BSA. The tubules were washed twice in this solution, and an additional time with KHB without BSA, and then were frozen in 10 mmol/L mannitol, 20 mmol/L Tris-HEPES (pH 7.4) at -80°C.

#### Luminal membrane purification

On the day of the experiment, the frozen proximal and distal tubules were thawed and homogenized, and the luminal membranes purified using the MgCl<sub>2</sub> precipitation technique: 12 mmol/L MgCl<sub>2</sub> (final concentration) was added to the suspension, which was stirred on ice for 20 minutes (proximal tubules) or 10 minutes (distal tubules) and centrifuged at 3000g for 20 minutes. The supernatants were collected and centrifuged at 28,000g for 20 minutes at 4°C. The membrane pellets were suspended in 280 mmol/L mannitol with 20 mmol/L Tris-HEPES (pH 7.4), and allowed to vesiculate at 4°C for one hour.

#### Calcium and sodium transport measurement

<sup>45</sup>Ca and <sup>22</sup>Na uptakes by the vesicles were measured by the rapid Millipore filtration technique. Uptakes were initiated by adding 25 µL of incubation medium at 35°C to 5 µL of membrane suspension (approximately 25 µg protein). In Ca<sup>2+</sup> transport experiments, the incubation medium contained, in addition to the <sup>45</sup>CaCl<sub>2</sub> at the indicated concentration, 20 mmol/L Tris-HEPES (pH 7.4) with either 120 mmol/L NaCl and 20 mmol/L choline chloride or 140 mmol/L choline chloride. Each uptake was stopped by addition of 1 mL of 150 mmol/L KCl, 20 mmol/L Tris-HEPES (pH 7.4), and 2 mmol/L EGTA,

**Table 1.** Enzyme activities in the membrane preparations

Preparation	Alkaline phosphatase nmol/µg/15 min	Na-K ATPase nmol/µg/20 min
Cortex	2.65 ± 0.24	3.40 ± 0.34
PT homogenates	2.66 ± 0.32	2.98 ± 0.34
Luminal membranes	14.59 ± 2.01 (×5.48)	2.05 ± 0.27 (×0.68)
Cortex	1.82 ± 0.17	1.70 ± 0.11
DT homogenates	0.40 ± 0.04 (×0.19)	1.09 ± 0.17 (×0.64)
DT LUM membranes	1.39 ± 0.10 (×0.76)	0.92 ± 0.09 (×0.54)

Data are mean values ± SEM, N = 12.

and the suspension rapidly filtered through Millipore filters. In <sup>22</sup>Na transport experiments, the incubation medium contained 278 mmol/L mannitol, 20 mmol/L Tris-HEPES (pH 7.4) and 1 mmol/L <sup>22</sup>NaCl, and the uptake was stopped by 1 mL of a solution containing 140 mmol/L LiCl<sub>2</sub> and 20 mmol/L Tris-HEPES (pH 7.4). In each experiment, the nonspecific binding was measured at time 0 of incubation and subtracted from the total uptake.

#### Enzyme marker measurements

The purity of the tubule suspensions and membranes was monitored by measurement of the specific enzyme markers (Table 1). Alkaline phosphatase (the proximal tubule luminal membrane specific enzyme) activity was determined according to the technique of Kelly and Hamilton [8], and Na-K-ATPase (the basolateral membrane marker) by the technique of Post and Sen [9]. Previous experiments performed with membranes prepared in same manner showed very low activities of succinate-dehydrogenase and glucose-phosphatase, indicating negligible contamination with mitochondrial or endoplasmic reticulum membranes [10].

#### Statistics and calculation

All of the uptake measurements were carried out in duplicate, and the figures reflect the mean values ± SEM of three to six experiments as indicated. The results were analyzed by the Student unpaired *t* test. The kinetic values of Ca<sup>2+</sup> uptake were calculated according to the nonlinear regression analysis of Huntson [11]. Passive diffusion was evaluated by the slope of Ca<sup>2+</sup> transport at saturating concentrations.

#### Materials

<sup>45</sup>CaCl<sub>2</sub> (carrier free) was obtained from Perkin-Elmer Life Science (Boston, MA, USA). Aldosterone, canrenone, spironolactone, cycloheximide, collagenase V, and other chemicals were obtained from Sigma Aldrich Company (St. Louis, MO, USA). ω-Conotoxin MVIIC was purchased from Calbiochem (San Diego, CA, USA), the filters from Millipore Co. (Bedford, MA, USA), and Mibefradil was kindly provided by Hoffman Laroche Co. (Basel, Switzerland).

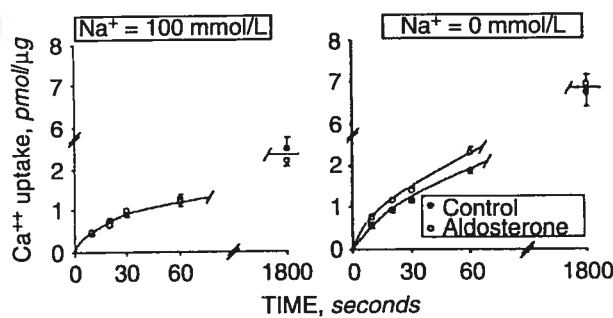


Fig. 1. Effect of  $10^{-8}$  mol/L aldosterone on 0.5 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by the distal luminal membrane in the presence ( $N=3$ ) and absence ( $N=5$ ) of 100 mmol/L  $\text{Na}^+$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with the control values from untreated tubules, unpaired  $t$  test.

## RESULTS

### Effect of aldosterone on $\text{Ca}^{2+}$ uptake by the proximal and distal luminal membranes

Probably caused by an absence [12], or a low level [13] of receptors, incubation of proximal tubules with aldosterone did not influence  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by the corresponding luminal membrane vesicles: 0.5 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  transports were  $0.51 \pm 0.05$  and  $0.49 \pm 0.04$  pmol/ $\mu\text{g}/10$  seconds in control and experimental conditions ( $N=3$ ).

The effect of  $10^{-8}$  mol/L aldosterone on  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by the distal luminal membranes is depicted in Figure 1. Because of the inhibitory action of  $\text{Na}^+$  upon  $\text{Ca}^{2+}$  transport, the experiments were performed in the absence and in the presence of 100 mmol/L NaCl. In the absence of  $\text{Na}^+$ , treatment of tubules with  $10^{-8}$  mol/L aldosterone enhanced 0.5 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  by the distal membranes from  $0.56 \pm 0.04$  to  $0.74 \pm 0.06$  pmol/ $\mu\text{g}/10$  seconds,  $P < 0.05$ , unpaired  $t$  test,  $N=6$ . In the presence of 100 mmol/L  $\text{Na}^+$ , however, the effect of the hormone was no longer evident ( $0.46 \pm 0.02$  vs.  $0.44 \pm 0.02$  pmol/ $\mu\text{g}/10$  seconds, NS).

### Effect of aldosterone on $\text{Na}^+$ uptake by the distal membranes

Confirming the well-documented action of aldosterone on  $\text{Na}^+$  reabsorption by the distal tubule, incubation of tubules with  $10^{-8}$  mol/L aldosterone enhanced 1 mmol/L  $\text{Na}^+$  uptake in the absence of  $\text{Ca}^{2+}$  in the medium, from  $0.60 \pm 0.02$  to  $0.98 \pm 0.04$  pmol/ $\mu\text{g}/10$  seconds ( $P < 0.01$ ,  $N=4$ ). In the presence of 2.0 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  uptake decreased but still remained sensitive to aldosterone ( $0.34 \pm 0.01$  and  $0.60 \pm 0.03$  pmol/ $\mu\text{g}/10$  seconds in control and experimental conditions, respectively,  $P < 0.01$ ,  $N=3$ ).

### Variation of $\text{Ca}^{2+}$ and $\text{Na}^+$ uptakes with the time of tubule incubation

Interestingly, the effect of the hormone on the transport of both cations was extremely rapid, as are most

of the hormonal actions on the distal nephron. Figure 2 presents the variation of 0.5 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  and 1.0 mmol/L  $\text{Na}^+$  uptakes with the time of tubule incubation. Indeed, a 5-minute incubation was sufficient to enhance both  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^+$  transports. Although not statistically significant for  $\text{Ca}^{2+}$  uptake, a stimulatory tendency was already detectable after a 1-minute incubation. However, after 15 minutes, the effect on  $\text{Ca}^{2+}$  uptake disappeared, whereas that on  $\text{Na}^+$  remained slightly more stable.

### The dose-response curve

To determine the efficient concentrations of aldosterone on  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^+$  uptakes, the distal tubules were incubated for 5 minutes with hormone concentrations varying from 0 to  $10^{-6}$  mol/L. As shown in Figure 3, the peak action was obtained at  $10^{-8}$  mol/L and above, with a half-maximal efficient concentration of  $10^{-10}$  mol/L. These concentrations are close to the physiologic values in human plasma ( $1$  to  $8 \times 10^{-9}$  mol/L in our hospital institution).

### The action of aldosterone on the kinetic parameters of $\text{Ca}^{2+}$ uptake

We repeatedly observed a dual kinetics of  $\text{Ca}^{2+}$  transport by the distal luminal membranes, an observation which corroborates the finding of at least two  $\text{Ca}^{2+}$  channels reported by Barry et al [14] using molecular cloning and antisense techniques, Suzuki et al [15] using electrophysiology techniques, Peng et al [16, 17], who expressed the two channels in *Xenopus laevis* oocytes, and Ohki G et al [abstract; *J Am Soc Nephrol* 12:757A, 2001], who characterized ECaC<sub>2</sub> mRNA in the mouse kidney. Unexpectedly, incubation of distal tubules with  $10^{-8}$  mol/L aldosterone for 5 minutes increased Vmax values of both kinetics, from  $0.42 \pm 0.03$  to  $0.57 \pm 0.06$  ( $P < 0.02$ ), and from  $1.27 \pm 0.19$  to  $2.03 \pm 0.30$  pmol/ $\mu\text{g}/10$  seconds ( $P < 0.02$ ,  $N=6$ ) for the high and the low affinity components, respectively (Fig. 4 and Table 2).

### Interference of $\text{Na}^+$ upon the effect of aldosterone on $\text{Ca}^{2+}$ transport

We have seen in Figure 1 that in the presence of 100 mmol/L  $\text{Na}^+$ ,  $10^{-8}$  mol/L aldosterone does not enhance any more 0.5 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by the distal luminal membranes. To further investigate this inhibitory effect of  $\text{Na}^+$ , the stimulation of  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by the hormone was measured in the presence of increasing concentrations of  $\text{Na}^+$ . As expected,  $\text{Na}^+$  decreased  $\text{Ca}^{2+}$  uptake, and the effect of aldosterone on this transport progressively disappeared (Fig. 5).

### The messengers involved in the action of aldosterone on $\text{Ca}^{2+}$ uptake

To clarify the mechanism of the hormone action, a new series of experiments was performed using various

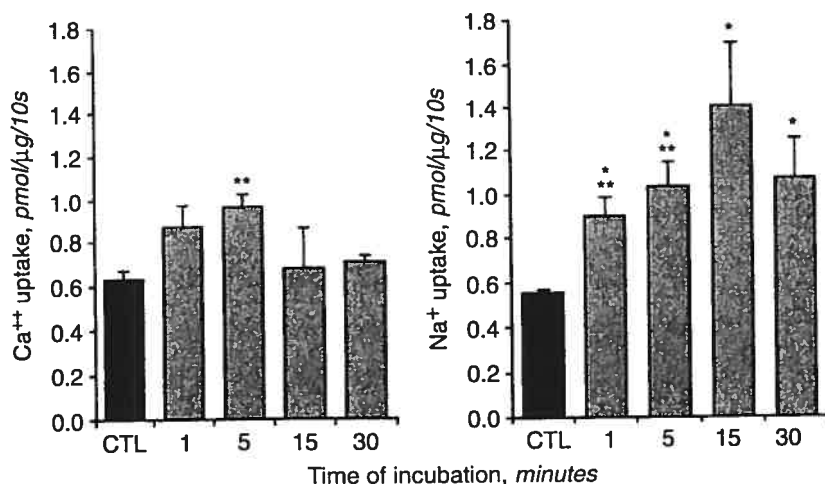


Fig. 2. Effect of  $10^{-8}$  mol/L aldosterone on 1 mmol/L  $\text{Na}^{+}$  and 0.5 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by the distal luminal membrane: variation with time of tubule incubation. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.02$ , \*\*\* $P < 0.01$  compared with the control values, unpaired  $t$  test,  $N = 3$ .

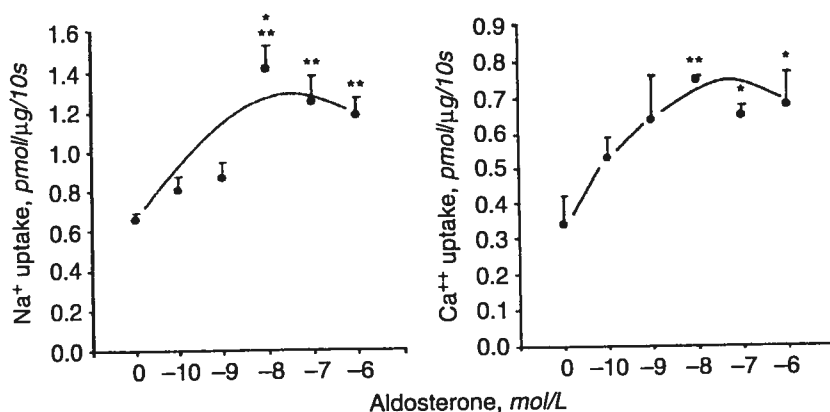


Fig. 3. Effect of  $10^{-8}$  mol/L aldosterone on 1 mmol/L  $\text{Na}^{+}$  and 0.5 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  uptakes by the distal luminal membrane: dose-response curves. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.02$ , \*\*\* $P < 0.01$  compared with the control values from untreated tubules, unpaired  $t$  test,  $N = 3$ .

messenger inhibitors: Rp cAMP (anti-cyclicAMP), calphostin C (anti-protein kinase C), SB 203580 (an anti-MAP kinase), and two anti-tyrosine kinases, AG 18 and genistein. Neither Rp cAMP nor calphostin C nor SB 203580 prevented the aldosterone-dependent increase in  $\text{Ca}^{2+}$  uptake: 0.5 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  uptake increased from  $0.51 \pm 0.02$  to  $0.87 \pm 0.075$  ( $P < 0.01$ ) and from  $0.53 \pm 0.015$  to  $0.92 \pm 0.01$  pmol/ $\mu\text{g}/10$  seconds ( $P < 0.02$ ) in the absence and presence of  $10^{-4}$  mol/L Rp cAMP, from  $0.57 \pm 0.15$  to  $0.84 \pm 0.18$  and  $0.62 \pm 0.12$  to  $0.94 \pm 0.24$  ( $P < 0.05$ ) pmol/ $\mu\text{g}/10$  seconds in the absence and presence of  $10^{-6}$  mol/L calphostin C, and from  $0.58 \pm 0.01$  to  $0.89 \pm 0.10$  ( $P < 0.05$ ) and  $0.63 \pm 0.02$  to  $0.88 \pm 0.06$  pmol/ $\mu\text{g}/10$  seconds ( $P < 0.01$ ) in the absence and presence of SB 203580. In contrast, the two tyrosine kinase inhibitors completely abolished the effect of aldosterone on 0.5 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  transport (Fig. 6, Table 3)

#### Effect of spironolactone and canrenone on the aldosterone dependent $\text{Ca}^{2+}$ uptake

In vivo, spironolactone is utilized as an aldosterone antagonist at the hormone receptors of the epithelial cells

of the kidney, and therefore is used in the treatment of hyperaldosteronism. Preliminary experiments failed to demonstrate any effect of  $10^{-6}$  mol/L spironolactone on  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by the distal luminal membranes; however, in vivo, spironolactone is metabolized mainly by the liver to active metabolites, among which is canrenone acid. Therefore, tubules were incubated with either  $10^{-6}$  mol/L canrenone alone,  $10^{-8}$  mol/L aldosterone alone, or aldosterone and canrenone. Then, 0.1 and 0.5 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  uptakes by the corresponding luminal membrane vesicles were measured. Canrenone did not inhibit the effect of aldosterone, neither on 0.1 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  ( $0.39 \pm 0.03$  vs.  $0.40 \pm 0.03$  pmol/ $\mu\text{g}/10$  seconds) nor on 0.5 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  transports ( $0.84 \pm 0.05$  vs.  $0.85 \pm 0.01$  pmol/ $\mu\text{g}/10$  seconds,  $N = 3$ ).

#### Effect of protein synthesis inhibition on the aldosterone action

Also suggesting a nongenomic mechanism implicated in the aldosterone action on  $\text{Ca}^{2+}$  uptake was the lack of influence of protein synthesis inhibition. In a new series of experiments, distal tubules were incubated with

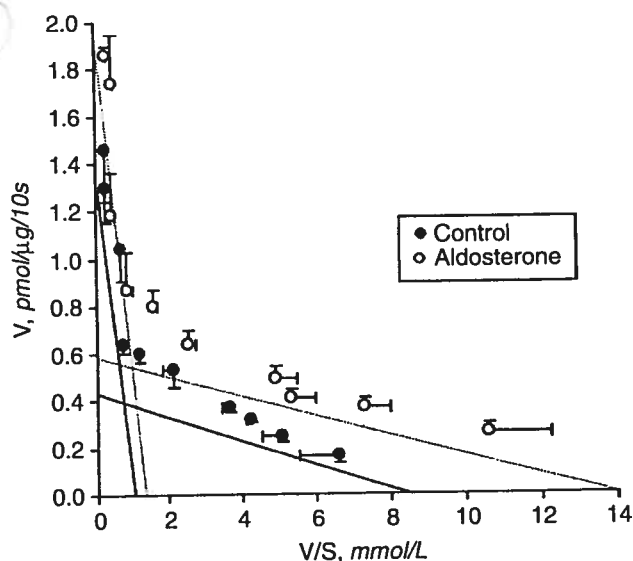


Fig. 4. Effect of  $10^{-8}$  mol/L aldosterone on the Eadie-Hofstee plot of  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by the distal luminal membrane,  $N = 3$ .

Table 2. Effect of  $10^{-8}$  mol/L aldosterone on  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by distal luminal membranes: Kinetics parameters

Component	Affinity	Control	Aldosterone
$K_m$ mmol/L	Low	$1.20 \pm 0.19$	$1.79 \pm 0.62$
	High	$0.052 \pm 0.007$	$0.041 \pm 0.006$
$V_{\max}$ pmol/μg/10s	Low	$1.27 \pm 0.19$	$2.03 \pm 0.30^a$
	High	$0.42 \pm 0.032$	$0.57 \pm 0.06^a$

<sup>a</sup>  $P < 0.02$  compared with control values,  $N = 6$ .

$10^{-8}$  mol/L aldosterone in the presence and the absence of  $10^{-6}$  mol/L cycloheximide. The inhibitor did not interfere with the hormone effect: 0.5 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  uptakes increased from  $0.51 \pm 0.03$  to  $0.85 \pm 0.06$  and from  $0.53 \pm 0.04$  to  $0.85 \pm 0.05$  pmol/μg/10 seconds ( $P < 0.01$ ,  $N = 3$ ) by membranes from control and treated tubules in the absence and presence of the inhibitor.

### What types of $\text{Ca}^{2+}$ channels are influenced by aldosterone?

According to the Eadie-Hofstee plot presented above, aldosterone enhanced  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by both the low and high affinity channels. To further characterize these channels, we studied the effects of various antagonists on vesicles prepared from control and aldosterone treated tubules: mibefradil, a T-type antagonist, diltiazem, a L-type antagonist, and  $\omega$ -conotoxin MVIIC, a P/Q type antagonist. Distal tubules were incubated with  $10^{-8}$  mol/L aldosterone or with the carrier for 5 minutes at  $35^\circ\text{C}$ . Then, luminal membranes were purified, and 0.1 or 0.5 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  uptakes by these membranes were measured both in the presence and absence of each inhibitor. In membranes from untreated tubules, 1 μmol/L

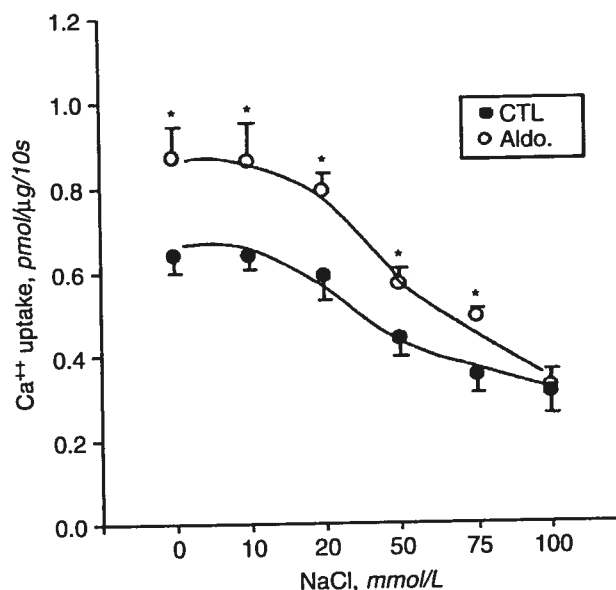


Fig. 5. Influence of  $\text{Na}^+$  concentration of the effect of  $10^{-8}$  mol/L aldosterone on 0.5 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by the distal luminal membrane. \*  $P < 0.05$  compared with the control values from untreated tubules, unpaired  $t$  test,  $N = 5$ .

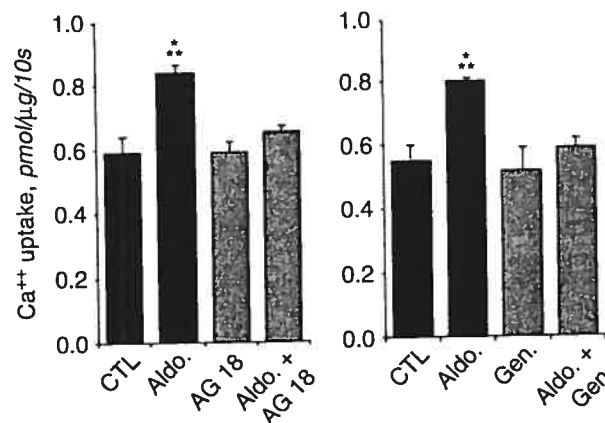
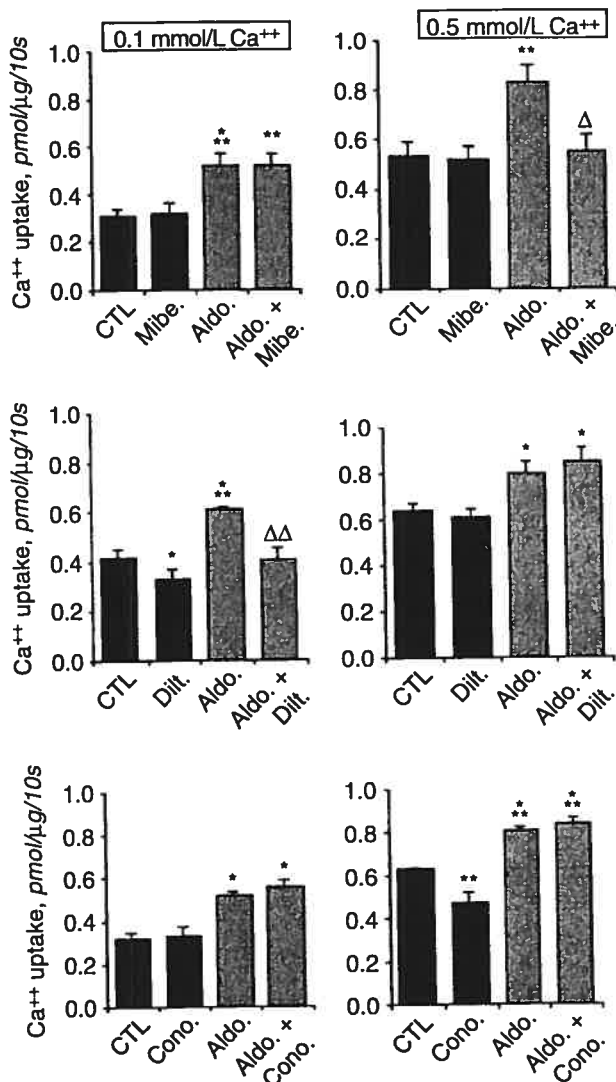


Fig. 6. Effect of two tyrosine-kinase inhibitors:  $5 \times 10^{-5}$  mol/L AG 18 and  $10^{-6}$  mol/L genistein on 0.5 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by membranes from distal tubules treated with  $10^{-8}$  mol/L aldosterone,  $N = 3$ .

mibefradil had no influence on either 0.1 or 0.5 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  transport, 50 μmol/L diltiazem slightly decreased 0.1 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  uptake from  $0.42 \pm 0.03$  to  $0.33 \pm 0.04$  pmol/μg/10 seconds ( $P < 0.05$ ,  $N = 3$ , paired  $t$  test) without affecting the 0.5 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  transport ( $0.64 \pm 0.03$  and  $0.61 \pm 0.03$  pmol/μg/10 seconds, NS), while 100 nmol/L  $\omega$ -conotoxin MVIIC decreased 0.5 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  uptake from  $0.63 \pm 0.01$  to  $0.47 \pm 0.05$  pmol/μg/10 seconds ( $P < 0.02$ ,  $N = 5$ ) without influencing the 0.1 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  transport ( $0.32 \pm 0.03$  and  $0.33 \pm 0.04$  pmol/μg/10 seconds, NS). In contrast to these modest effects on membranes from untreated tubules, mibefradil

**Table 3.** Effect of tyrosine kinase inhibition on the aldosterone sensitive 0.5 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  uptake (pmol/ $\mu\text{g}/10\text{s}$ )

Control	0.59 $\pm$ 0.05	Control	0.55 $\pm$ 0.05
Aldosterone	0.84 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	Aldosterone	0.80 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
AG 18	0.59 $\pm$ 0.32	Genistein	0.53 $\pm$ 0.07
Aldo + AG 18	0.65 $\pm$ 0.02	Aldo + Genistein	0.59 $\pm$ 0.03

<sup>a</sup> $P < 0.01$  compared with the control values,  $N = 3$ .**Fig. 7.** Effect of 1  $\mu\text{mol/L}$  mibefradil, 50  $\mu\text{mol/L}$  diltiazem, or 100 nmol/L  $\omega$ -conotoxin MVIIC on 0.1 or 0.5 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by membranes from control or aldosterone treated distal tubules. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.02$ , \*\*\* $P < 0.01$  compared with the control values from untreated membranes, paired  $t$  test;  $\Delta P < 0.05$  and  $\Delta\Delta P < 0.02$  compared with the values obtained with untreated membranes, but from tubules incubated with aldosterone,  $N = 4$ .

and diltiazem strongly diminished the  $\text{Ca}^{2+}$  transport response to the hormone, and again, their inhibitory effects depended upon  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. As reproducibly observed,  $10^{-8}$  mol/L aldosterone enhanced both

0.1 mmol/L and 0.5 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  uptakes. Diltiazem (50  $\mu\text{mol/L}$ ) completely abolished the effect of aldosterone on 0.1 mmol/L, but not on 0.5 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  transport, whereas 1  $\mu\text{mol/L}$  mibefradil prevented the hormone influence on 0.5 mmol/L but not on 0.1 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  uptake. Finally, 100 nmol/L  $\omega$ -conotoxin MVIIC failed to modify the response to  $10^{-8}$  mol/L aldosterone at any of the two concentrations of  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 7).

These results suggest that aldosterone activates two different types of  $\text{Ca}^{2+}$  channels, the diltiazem-sensitive L-type, and the mibefradil-sensitive T-type. The P/Q type, which has also been described in the distal membrane, and which is sensitive to  $\omega$ -conotoxin MVIIC [abstract; Brunette MG et al, *J Am Soc Nephrol*, 13:281A, 2002], does not appear to respond to aldosterone.

#### An attempt to detect a direct action of aldosterone on membrane vesicles

$\text{Ca}^{2+}$  transport by the luminal membrane of the distal nephron can be influenced by hormones, according to a direct mechanism. For instance, it has been shown that the addition of progesterone to the vesicle suspensions significantly enhances  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by these membranes [18]. In an attempt to search for such a mechanism in our membrane preparations, aldosterone at concentrations varying from  $10^{-6}$  to  $10^{-10}$  mol/L was added to the vesicle suspensions, and the 10-second 0.5 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  uptake was measured. None of the hormone concentrations tested influenced  $\text{Ca}^{2+}$  transport.

## DISCUSSION

### Aldosterone, a hormone that enhances both $\text{Na}^+$ and $\text{Ca}^{2+}$ transports by the distal tubules: An exception

As mentioned above, for several decades now, aldosterone has been known to increase  $\text{Na}^+$  transport, and therefore, short-circuit current, through toad bladder cells, A6 cells, rat distal tubules, or microperfused rat and rabbit collecting ducts. Therefore, our data confirm this well-documented action on  $\text{Na}^+$  channels. However, aldosterone also enhances  $\text{Ca}^{2+}$  reabsorption by the distal nephron. This was an unexpected finding because most of the  $\text{Ca}^{2+}$  regulating hormones, such as parathyroid hormone [19, 20], calcitonin [21, 22], calbindin 28K [23], and angiotensin II [24] act on the two cation transports in opposite directions. Several hypotheses could explain this unusual hormonal effect: aldosterone may target a non-specific cation channel permeable to both  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$ , and therefore, different from those which are sensitive to the hormones cited above. Alternatively, aldosterone may open separately the  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  channels, situated either in the same or in different distal segments.

The fact that  $\text{Na}^+$  interferes with the hormone action on  $\text{Ca}^{2+}$  uptake does not argue against an *in vivo* action.

Indeed,  $\text{Na}^+$  is actively reabsorbed in the ascending limb of the loop of Henle and the distal tubule, so that in the distal segments, this electrolyte concentration within the lumen is relatively low (i.e., around 40 mmol/L) [25].

#### **Aldosterone increases the $V_{\text{max}}$ of the two $\text{Ca}^{2+}$ uptake kinetics**

Recently, Alvarez de la Rosa et al [26] investigated the effect of aldosterone on the activity of the  $\text{Na}^+$  channel ENaC in the A6 cell line. They observed that the hormone induces a fourfold increase in the amount of the three subunits in the apical membrane, but does not influence the opening probability. Our observations that aldosterone increased the  $V_{\text{max}}$  of the two kinetic components without affecting the  $K_m$  values are consistent with a similar mechanism (i.e., an increase in the number of active  $\text{Ca}^{2+}$  channels, in the absence of any influence upon the opening probability).

#### **There are several sites of aldosterone receptors in the distal nephron**

Aldosterone-sensitive  $\text{Na}^+$  channels have been reported in cells of different origins, suggesting that several segments of the distal nephron contribute to the action of aldosterone.  $^3\text{H}$  aldosterone-binding experiments, for instance, showed multiples sites of receptors. In the rat, Funder et al [27] observed the presence of such bindings in both the cortex and medulla. In the rabbit, aldosterone binding has been precisely described in the distal convoluted tubule, the connecting, and the collecting tubules [12, 28]. Interestingly, characteristics of these bindings at the various sites present some variations: Marver et al [29–31] reported that the cortex and the outer medulla contain high affinity sites of binding (kD aldosterone 3 nmol/L), whereas papilla slices present low affinity sites (kD 28 nmol/L). Farman et al [32] further characterized these two types of binding: in the cortex,  $^3\text{H}$  aldosterone bound to the bright (DCTb) and the granular (DCTg) segments of the distal convoluted tubules, and was displaced by both aldosterone and dexamethasone, whereas in the cortical collecting tubule, only aldosterone had this ability. These authors concluded that variations within these receptor populations were present. Finally, Todd-Turla et al [13] quantified the levels of mineralocorticoid and glucocorticoid receptor mRNA along the nephron. Mineralocorticoid mRNA was particularly abundant in cortical, outer, and inner medulla collecting duct segments, whereas the glucocorticoid mRNA was more abundant in the proximal tubules and thick ascending limbs. It is therefore probable that the complexity of the aldosterone action on  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^+$  transports by two  $\text{Ca}^{2+}$  channels in the distal nephron is related to the multiplicity of sites of action.

#### **Neither the presence of spironolactone, nor canrenone, nor cycloheximide, in the tubule suspension prevented the effect of aldosterone**

In vivo spironolactone plays its aldosterone antagonist role only after its conversion into canrenone by the liver [33–35]. Thus, the failure to demonstrate an in vitro inhibitory effect of spironolactone is easily explainable by the absence of such a conversion in our tubule suspensions. However, the addition of canrenone to the tubule suspension did not prevent the effect of aldosterone either. Canrenone targets cytoplasmic steroid receptors, whose binding to the hormone is a necessary step for a genomic activity. Also suggesting a nongenomic mechanism is the lack of influence of cycloheximide, the protein synthesis inhibitor. Therefore, the action of aldosterone observed in the present experiments reflects a nongenomic mechanism, independent of these cytoplasmic receptors, and implicating other types of receptors such as those previously described in various kidney cells or kidney plasma membranes [36–40].

#### **The role of tyrosine kinase in the action of aldosterone**

Our data failed to demonstrate any influence of PKA, PKC, or P38 MAP kinase on the aldosterone-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  uptake. This was an unexpected finding because a previous study performed in skeletal muscle cell cultures reported a fast transient  $\text{Ca}^{2+}$  increase, accompanied by a rise in  $\text{IP}_3$  content of these cells, reflecting a PKC stimulation [41]. Instead of such a mechanism, our data suggests the implication of a tyrosine-kinase. It is therefore probable that different messengers are required in the rapid nongenomic and the slow genomic actions of the hormone.

Indeed, Gekle et al [42] reported experiments performed in Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells, showing that the nongenomic effect of aldosterone on  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger activity was caused by an activation of the epidermal growth factor receptor, phosphorylation of ERK1/2 by a tyrosine-kinase, and subsequently, opening of  $\text{Ca}^{2+}$  channels,  $\text{Ca}^{2+}$  influx, and finally, stimulation of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger. Inhibition of the activation of epidermal growth factor receptor, and then of tyrosine kinase activity abolished the aldosterone action.

#### **Aldosterone influences L- and T-types of $\text{Ca}^{2+}$ channels**

*Several sites of action, but also several types of channels.* Indeed, the present data suggest that the hormone enhances at least two types of  $\text{Ca}^{2+}$  channel activity in the distal luminal membranes. We previously reported that the low affinity component of  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by these membrane is sensitive to calcitonin [22], and the high affinity component to PTH [20], the vitamin D dependent calbindin 28K [43], estrogen [44], progesterone [18], and

angiotensin II [24]. As mentioned above, the presence of several types of  $\text{Ca}^{2+}$  channels has also been reported in a number of studies using several techniques, among which are electrophysiology and molecular biology [14–17].

It is the first time, however, that we have the opportunity to describe a hormone that influences several types of channels. The high affinity channel has been previously reported, as in the present study, to be sensitive to diltiazem and, therefore, to belong to a L-type, whereas the low affinity channel is sensitive to  $\omega$ -conotoxin MVIIC, which preferentially targets the P/Q type. We now report the presence of another category of channels in the distal nephron segment, which is aldosterone dependent, and which is inhibited by mibefradil, the specific T-channel inhibitor. This inhibition was observed only with high concentrations of  $\text{Ca}^{2+}$ . Therefore, the low affinity component reflects the activity of at least two  $\text{Ca}^{2+}$  channels, of P/Q- and T-types. The luminal membrane of the distal nephron is a very complex structure that is the site of at least three  $\text{Ca}^{2+}$  channels that are differently regulated by a variety of hormones, including aldosterone.

## CONCLUSION

These in vitro experiments showed that the incubation of rabbit distal tubules with aldosterone enhances transport of both  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  by the luminal membranes, implicating a tyrosine kinase activity. Kinetics studies suggest that at least two types of  $\text{Ca}^{2+}$  channels are influenced by the hormone: a high affinity channel whose response to aldosterone is inhibited by diltiazem (a L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel inhibitor), and a low affinity channel, whose response is curtailed by mibefradil (a T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel inhibitor). Because only the  $V_{\text{max}}$  of both kinetics components of  $\text{Ca}^{2+}$  uptake is affected, we conclude that aldosterone increases the number of channels present in the membranes without influencing the affinity of these channels for  $\text{Ca}^{2+}$ .

The apparent discrepancy between some previous  $\text{Ca}^{2+}$  clearance studies and the present data can be easily explained by the complex in vivo situation. It is likely that in these former experiments, the direct enhancement of  $\text{Ca}^{2+}$  transport by aldosterone was hidden by  $\text{Na}^+$  retention, secondary volume expansion, and decrease in proximal tubule reabsorption.

## ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by the Medical Research Council of Canada #MT 11307. The authors are grateful to Jean-Marie Bélanger for kindly providing the rabbit kidneys, and to Drs. Eva-Maria Gutknecht and Pierre Weber from Hoffman Laroche for their generous gift of mibefradil. Additional grant sponsorship was provided by the Canadian Institutes of Health Research #MT-37911.

Reprint requests to Dr. Michèle G. Brunette, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, 5415, boul. de l'Assomption, Montréal (Québec) H1T 2M4.  
E-mail: [REDACTED]

## REFERENCES

1. AUGUST JT, NELSON DH, THORN GW: Response of normal subjects to large amounts of aldosterone. *J Clin Invest* 37:1549–1555, 1958
2. SUKI WN, SCHWETTMANN RS, RECTOR FC, JR., SELDIN DW: Effect of chronic mineralocorticoid administration on calcium excretion in the rat. *Am J Physiol* 215:71–74, 1968
3. LEMANN J, JR., PIERING WF, LENNON EJ: Studies of the acute effects of aldosterone and cortisol on the interrelationship between renal sodium, calcium and magnesium excretion in normal man. *Nephron* 7:117–130, 1970
4. PAUNIER L, BORGEAUD M, WYSS M: Acute effect of aldosterone on tubular calcium and magnesium reabsorption. *Helv Med Acta* 36:265–275, 1972
5. VAN HAMERSVELT HW, WETZELS JF, KLOKE HJ, et al: Exogenous aldosterone antagonizes distal tubular effects of calcium entry blocker felodipine. *Am J Physiol* 266:F843–849, 1994
6. RESNICK LM, LARAGH JH: Calcium metabolism and parathyroid function in primary aldosteronism. *Am J Med* 78:385–390, 1985
7. KABADI UM: Renal calculi in primary hyperaldosteronism. *Postgrad Med J* 71:561–562, 1995
8. KELLY MH, HAMILTON JR: A micro-technique for the assay of intestinal alkaline phosphatase. Results in normal children and in children with celiac disease. *Clin Biochem* 3:33–43, 1970
9. POST RS, SEN AK: Sodium and potassium stimulated ATPase. *Methods Enzymol* 10:762–768, 1967
10. BRUNETTE MG, MAILLOUX J, LAJEUNESSE D: Calcium transport through the luminal membrane of the distal tubule. I. Interrelationship with sodium. *Kidney Int* 41:281–288, 1992
11. HUNTSON DL: Two techniques for evaluating small molecule macromolecule binding in complex systems. *Anal Biochem* 63:99–109, 1975
12. VANDEWALLE A, FARMAN N, BENCATH P, BONVALET JP: Aldosterone binding along the rabbit nephron: An autoradiographic study on isolated tubules. *Am J Physiol* 240:F172–F179, 1981
13. TODD-TURLA KM, SCHNERMANN J, FEJES-TOTH G, et al: Distribution of mineralocorticoid and glucocorticoid receptor mRNA along the nephron. *Am J Physiol* 264:F781–F791, 1993
14. BARRY EL, GESEK FA, YU AS, et al: Distinct calcium channel isoforms mediate parathyroid hormone and chlorothiazide-stimulated calcium entry in transporting epithelial cells. *J Membr Biol* 161:55–64, 1998
15. SUZUKI M, ISHIBASHI K, OOKI G, et al: Electrophysiologic characteristics of the Ca-permeable channels, ECaC and CaT, in the kidney. *Biochem Biophys Res Commun* 274:344–349, 2000
16. PENG JB, CHEN XZ, BERGER UV, et al: A rat kidney-specific calcium transporter in the distal nephron. *J Biol Chem* 275:28186–28194, 2000
17. PENG JB, HEDIGER MA: A family of calcium-permeable channels in the kidney: Distinct roles in renal calcium handling. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 11:555–561, 2002
18. BRUNETTE MG, LECLERC M: Renal action of progesterone: Effect on calcium reabsorption. *Mol Cell Endocrinol* 194:183–190, 2002
19. COSTANZO LS, WINDHAGER EE: Effects of PTH, ADH, and cyclic AMP on distal tubular Ca and Na reabsorption. *Am J Physiol* 239:F478–F485, 1980
20. LAJEUNESSE D, BOUHTIAUY I, BRUNETTE MG: Parathyroid hormone and hydrochlorothiazide increase calcium transport by the luminal membrane of rabbit distal nephron segments through different pathways. *Endocrinology* 134:35–41, 1994
21. MEROT J, BIDET M, GACHOT B, et al: Electrical properties of rabbit early distal convoluted tubule in primary culture. *Am J Physiol* 257:F288–F299, 1989
22. ZUO Q, CLAVEAU D, HILAL G, et al: Effect of calcitonin on calcium transport by the luminal and basolateral membranes of the rabbit nephron. *Kidney Int* 51:1991–1999, 1997
23. BRUNETTE MG, LECLERC M, HUO TL, et al: Effect of calbindin D 28K on sodium transport by the luminal membrane of the rabbit

- nephron. *Mol Cell Endocrinol* 152:161–168, 1999
4. CHARBONNEAU A, LECLERC M, BRUNETTE MG: Effect of angiotensin II on calcium reabsorption by the luminal membranes of the nephron. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280:E928–E936, 2001
25. SCHNERMANN J, BRIGGS J, SCHUBERT G: In situ studies of the distal convoluted tubule in the rat. I. Evidence for NaCl secretion. *Am J Physiol* 243:F160–F166, 1982
26. ALVAREZ DE LA ROSA D, LI H, CANESSA CM: Effects of aldosterone on biosynthesis, traffic, and functional expression of epithelial sodium channels in A6 cells. *J Gen Physiol* 119:427–442, 2002
27. FUNDER JW, FELDMAN D, EDELMAN IS: Specific aldosterone binding in rat kidney and parotid. *J Steroid Biochem* 3:209–218, 1972
28. BONVALET JP: Binding and action of aldosterone, dexamethasone, 1–25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, and estradiol along the nephron. *J Steroid Biochem* 27:953–961, 1987
29. MARVER D: Aldosterone receptors in rabbit renal cortex and red medulla. *Endocrinology* 106:611–618, 1980a
30. MARVER D, SCHWARTZ MJ: Identification of mineralocorticoid target sites in the isolated rabbit cortical nephron. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:3672–3676, 1980b
31. MARVER D, KOKKO JP: Renal target sites and the mechanism of action of aldosterone. *Miner Electrolyte Metab* 9:1–18, 1983
32. FARMAN N, VANDEWALLE A, BONVALET JP: Aldosterone binding in isolated tubules. II. An autoradiographic study of concentration dependency in the rabbit nephron. *Am J Physiol* 242:F69–F77, 1982
33. ANDRIULLI A, ARRIGONI A, GINDRO T, et al: Canrenone and androgen receptor-active materials in plasma of cirrhotic patients during long-term K-canrenoate or spironolactone therapy. *Digestion* 44:155–162, 1989
34. GANGULY A: Primary aldosteronism. *N Engl J Med* 339:1828–1834, 1998
35. DOGGRELL SA, BROWN L: The spironolactone renaissance. *Expert Opin Investig Drugs* 10:943–954, 2001
36. OZEGOVIC B, DOBROVIC-JENIK D, MILKOVIC S: Solubilization of rat kidney plasma membrane proteins associated with 3H-aldosterone. *Exp Clin Endocrinol* 92:194–198, 1988
37. WEHLING M: Rapid effects of aldosterone: A novel concept of nongenomic steroid action evolves, in *Genomic and Non-genomic Effects of Aldosterone*, edited by Wehling M, Florida, USA, CRC Press, 1994, pp 109–149
38. GEKLE M, GOLENHOFEN N, OBERLEITHNER H, SILBERNAGL S: Rapid activation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange by aldosterone in renal epithelial cells requires Ca<sup>2+</sup> and stimulation of a plasma membrane proton conductance. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:10500–10504, 1996
39. HARVEY BJ, HIGGINS M: Nongenomic effects of aldosterone on Ca<sup>2+</sup> in M-1 cortical collecting duct cells. *Kidney Int* 57:1395–1403, 2000
40. KOPPEL H, CHRIST M, YARD BA, et al: Nongenomic effects of aldosterone on human renal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 88:1297–1302, 2003
41. ESTRADA M, LIBERONA JL, MIRANDA M, JAIMOVICH E: Aldosterone- and testosterone-mediated intracellular calcium response in skeletal muscle cell cultures. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279:E132–E139, 2000
42. GEKLE M, FREUDINGER R, MILDENBERGER S, SILBERNAGL S: Aldosterone interaction with epidermal growth factor receptor signaling in MDCK cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 282:F669–F679, 2002
43. BOUHTIAUY I, LAJEUNESSE D, CHRISTAKOS S, BRUNETTE MG: Two vitamin D<sub>3</sub>-dependent calcium binding proteins increase calcium reabsorption by different mechanisms. I. Effect of CaBP 28K. *Kidney Int* 45:461–468, 1994
44. BRUNETTE MG, LECLERC M: Effect of estrogen on calcium and sodium transport by the nephron luminal membranes. *J Endocrinol* 170:441–450, 2001